Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik
der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. L. Koslowski

# Permeabilitätsänderungen am Lipid-Bilayer durch natives Hautprotein, Verbrennungstoxin und Komplement im Hinblick auf die Ätiologie der Verbrennungskrankheit

INAUGURAL—DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard - Karls - Universität
Tübingen

vorgelegt von
MICHAEL ROGGENBROD
aus Ebingen

1983

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik
der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. L. Koslowski

# Permeabilitätsänderungen am Lipid-Bilayer durch natives Hautprotein, Verbrennungstoxin und Komplement im Hinblick auf die Ätiologie der Verbrennungskrankheit

INAUGURAL—DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard - Karls - Universität
Tübingen

vorgelegt von
MICHAEL ROGGENBROD
aus Ebingen

1983

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

| | |
|---|---|
| Dekan: | Professor Dr. W. Frommhold |
| 1. Berichterstatter: | Privatdozent Dr. Dr. K. Schmidt |
| 2. Berichterstatter: | Professor Dr. L. Koslowski |

---

gedruckt bei H.- J. Köhler · Reprografischer Betrieb · Tübingen

Inhaltsverzeichnis


1.1. Einleitung . . . . . 1
1.2. Pathologische Anatomie der Verbrennung . . . . 2
1.3. Pathophysiologie der Verbrennung . . . . . 3
1.4. Die Verbrennungskrankheit . . . . . 5
1.4.1. Der Verbrennungstod . . . . . 6
1.4.2. Charakterisierung giftiger Substanzen bei der Verbrennung . . . . . 6
2.1. Eigene Beobachtungen und Meßwerte . . . . . 11
2.1.1. Wahl geeigneter Untersuchungsmodelle . . . . . 11
2.1.2. Gewinnung des Verbrennungstoxins aus Mäusehaut 12
2.2. Eigenschaften des Verbrennungstoxins . . . . . 15
2.3. Humanerythrozyten als biologische Modellmembran 16
2.4. Hämolyseversuche . . . . . 16
2.4.1. Erythrozytenhämolyse durch unterschiedliche SDS-Konzentrationen (SDS = Natrium-Dodecylsulfat) . 16
2.4.2. Erythrozytenhämolyse durch unterschiedliche Verbrennungstoxinkonzentrationen . . . . . 19
2.4.3. Hämatokritbestimmung nach Wechselwirkung mit Verbrennungstoxin . . . . . 24
2.4.4. $Na^+$- und $K^+$-Konzentration unter Wirkung von Verbrennungstoxin . . . . . 26
2.4.4.1. $Na^+$-Konzentration . . . . . 26
2.4.4.2. $K^+$-Konzentration . . . . . 30
2.5. Der Lipid-Bilayer (Black Membrane) als Modell einer künstlichen Membran . . . . . 30
2.5.1. Vergleich zwischen biologischer und künstlicher Membran . . . . . 33
2.5.2. Material und Methoden . . . . . 33

2.6. Valinomycin als positive Kontrolle . . . . . 35

2.7. Wechselwirkung der ox. Cholesterin/n-Dekan-Membran mit Endotoxin aus Escherichia Coli . 39

2.8. Wechselwirkung der ox. Cholesterin/n-Dekan-Membran mit delipidiertem Nativ-Protein aus Mäusehaut . . . . . 44

2.8.1. Delip. Nativ-Protein-Fraktion N (I) . . . . . 44

2.8.2. Delip. Nativ-Protein-Fraktion N (II) . . . . 45

2.8.3. Delip. Nativ-Protein-Fraktion A (I) . . . . . 46

2.8.4. Delip. Nativ-Protein-Fraktion A (II) . . . . 48

2.9. Wechselwirkung der ox. Cholesterin/n-Dekan-Membran mit Toxin aus verbrannter Haut . . . . 49

2.10. Wechselwirkung der ox. Cholesterin/n-Dekan-Membran mit Homogenisat verbrannter Mäusehaut . . . . . 51

2.11. Wechselwirkung der ox. Cholesterin/n-Dekan-Membran mit flüchtigen Substanzen aus verbrannter Haut . . . . . 52

2.12. Wechselwirkung der ox. Cholesterin/n-Dekan-Membran mit Dialysat aus verbrannter Haut . . 52

2.13. Wechselwirkung der ox. Cholesterin/n-Dekan-Membran mit Dialysat aus unverbrannter Haut . 52

2.14. Wechselwirkung der ox. Cholesterin/n-Dekan-Membran mit Lyophilisat aus verbrannter und unverbrannter Haut . . . . . 52

2.15. Wechselwirkung der ox. Cholesterin/n-Dekan-Membran mit denaturiertem Humanalbumin . . . . 53

2.16. Wechselwirkung der ox. Cholesterin/n-Dekan-Membran mit Komplement . . . . . 54

2.16.1. Definition des Komplement-Systems . . . . . 54

2.16.2. Histologische Herkunft der Komplement-Komponenten . . . . . 54

2.16.2.1. Komplement C 1 . . . . . 54
2.16.2.2. Komplement C 2 . . . . . 55
2.16.2.3. Komplement C 3 . . . . . 55
2.16.2.4. Komplement C 4 . . . . . 55
2.16.2.5. Komplement C 5 . . . . . 55
2.16.2.6. Komplement C 6 . . . . . 55
2.16.2.7. Komplement C 7 . . . . . 56
2.16.2.8. Komplement C 8 . . . . . 56
2.16.2.9. Komplement C 9 . . . . . 56
2.16.3. Membranschädigung durch die achte (C 8) und neunte (C 9) Komponente . . . . . 56
2.17. Leitfähigkeitsänderungen des Lipid-Bilayers durch Komplement . . . . . 63
2.17.1. Meerschweinchenkomplement (25°C) . . . . . 64
2.17.2. Meerschweinchenkomplement (40°C) . . . . . 65
2.17.3. Meerschweinchenkomplement (60°C) . . . . . 65
2.17.4. Meerschweinchenkomplement (80°C) . . . . . 66
2.17.5. Meerschweinchenkomplement und Escherichia Coli Endotoxin . . . . . 67
2.17.6. Meerschweinchenkomplement und delip. Nativhaut 68
2.18. Möglichkeiten der Komplementaktivierung . . . 68
2.18.1. Der klassische Weg . . . . . 68
2.18.2. Der "Alternate Pathway" oder sog. Nebenschluß 69
3.1. Diskussion . . . . . 74
3.1.1. Erythrozytenhämolyse durch delipidiertes Nativprotein aus Haut (identisch mit dem nativen Precursor) . . . . . 74
3.1.2. Permeabilitätserhöhung am Lipid-Bilayer durch Valinomycin, delip. natives Protein (Precursor) und delip. Verbrennungstoxin . . . . . 78
3.1.3. Permeabilitätserhöhung am Lipid-Bilayer durch Meerschweinchenkomplement . . . . . 81

3.1.4. Substanzen ohne Leitfähigkeitssteigerung an der ox. Cholesterin/n-Dekan-Membran . . . . . 83
3.1.5. Escherichia Coli Endotoxin und Meerschweinchenkomplement . . . . . 84
3.1.6. Delipidiertes Nativ-Protein und Meerschweinchenkomplement . . . . . 85
3.2. Delipidiertes Nativ-Protein (Precursor) und Toxin aus verbrannter Haut. Aufbau und Wirkmechanismus am Lipid-Bilayer . . . . . 86
3.3. Nativer Precursor, Verbrennungstoxin und Komplement . . . . . 87
3.4. Möglichkeiten der Aktivierung von Verbrennungstoxin . . . . . 89
4. Zusammenfassung . . . . . 97
5. Literatur . . . . . 100
6. Tabellenanhang . . . . . 110

## 1.1. Einleitung

Die Beschreibung der Verbrennung mit ihren konsekutiven Störungen der Homöostase des Organismus sowie der Behandlung der Verbrennung ist im internationalen Schriftum außerordentlich reichhaltig.
Trotz eindrucksvollen Forschungsaufwandes kann bei Betrachtung der Mortalitätsstatistiken nicht verborgen bleiben, daß gerade in den letzten Jahrzehnten eine Stagnation eingetreten ist. Auch heute gelingt es trotz modernster Intensivpflege vielfach nicht, Patienten mit großflächigen zweit- bis drittgradigen Verbrennungen zu retten.
Während früher die Wasser-, Elektrolyt-, Eiweiß- und Wärmeverluste in Verbindung mit der Wundinfektion als alleinige Ursachen der schweren Störungen angesehen wurden, hat das sprunghafte Ansteigen der Spättodesfälle gerade nach sorgfältiger Ausbalancierung dieser Verluste zu einem teilweisen Umdenken hinsichtlich der Ätiologie gezwungen.
Die molekularpathologische Betrachtungsweise der Verbrennungskrankheit bekam ihren entscheidenden Aufschwung erst durch die Arbeiten von KOSLOWSKI über die Bedeutung autolytischer Veränderungen (27) und die Isolierung eines "Burn Toxin" aus der verbrannten Haut durch BURRI und ALLGÖWER (6) sowie die Gruppe um ROSENTHAL (38 - 43).

Die Vielfältigkeit der Pathophysiologie und Pathobiochemie der Verbrennung ergibt einen breiten Fächer von möglichen Ansatzpunkten für die experimentelle Erforschung der Verbrennung.

Speziell für das Phänomen der Verbrennungskrankheit mit seiner bis heute leider ungeklärten Spätletalität ist es schwer, ein geeignetes experimentelles Modell zu finden.
SCHMIDT (47, 48) diskutiert das Erscheinungsbild der Verbrennungskrankheit entweder als Einschwemmung von Substanzen (Precursoren) in den Kreislauf, die vor dem Verbrennungstrauma

durch Diffusionsschranken abgetrennt waren, so daß derselbe Effekt auch ohne thermische Einwirkung erzielbar und eine verbrennungsspezifische Reaktionskette nicht gegeben sei, oder als eine Entfaltung toxischer Wirkungen der im Verlauf der Verbrennungskrankheit neu entstandenen Verbindungen.
Ein pauschaler Toxizitätsbegriff ist bei derartigen Fragestellungen zur Charakterisierung der biologischen Wirkungen nicht hinreichend, seine Anwendung auf ein so komplexes Substanzgemisch wie die isolierten Bestandteile verbrannter Haut ohne großen Informationswert. Erst die nähere chemische Charakterisierung der Komponenten und ihrer biologischen Wirkungen in möglichst scharf definierten Testsystemen vermag die Situation zu erhellen.
Besonders unglücklich ist die Verwendung des Begriffs "Toxin" für die in der Haut entstehenden Umwandlungsprodukte, wobei jede Forschungsgruppe hierunter etwas anderes versteht.
In den meisten Fällen sind die isolierten Bestandteile chemisch schlecht charakterisiert und ihre Wirkungen daher kaum nachprüfbar.

Ziel dieser Arbeit ist nun, ein System zu erarbeiten, das die aus der Haut isolierten Bestandteile auf Grund ihrer Wirkung an standardisierten Testsystemen (Erythrozyt; Lipid-Bilayer) näher zu charakterisieren versucht, im Hinblick auf eine bessere Aufarbeitung der Hautprodukte mit gleichzeitigem Ausblick auf einen möglichen Wirkmechanismus im biologischen System.

### 1.2. Pathologische Anatomie der Verbrennung

Die Einteilung der Verbrennungen erfolgt derzeit in drei Grade. Hierbei gibt es natürlich auch Zwischenstufen, besonders wenn bei einer Verbrennung alle Grade erreicht

werden.

Verbrennung 1. Grades:
Entsteht bei mittleren Temperaturen (45°C bis 50°C):
Ödem und Hyperämie der Epidermis.

Verbrennung 2. Grades:
Bei länger einwirkenden Temperaturen oder bei höheren Temperaturen:
oberflächliche Verbrennung:
Exsudat zwischen dem Stratum Germinativum der Dermis und der Epidermis. Blasenbildungen zwischen diesen Schichten mit eiweißhaltiger Flüssigkeit.

tiefe zweigradige Verbrennung:
Schädigung des Coriums. Regeneration der Haut noch möglich.

Verbrennung 3. Grades:
Nekrose aller Hautschichten bis zum subcutanen Fettgewebe. Defektheilung per granulationem.

1.3. Pathophysiologie der Verbrennung

Die Intensität der thermischen Schädigung ist abhängig von der Kalorienzufuhr pro Zeiteinheit und pro Flächeneinheit der Körperoberfläche.

Die Hitzeeinwirkung erzeugt eine Freisetzung von Histamin, von dem die Haut mehr enthält als irgendein anderes Körpergewebe. Der Histaminspiegel im Blut ist bereits eine Stunde nach der Schädigung um das Acht- bis Zehnfache der Norm erhöht. Diese Histaminämie dauert aber nur wenige Stunden. Ein großer Teil des freigesetzten Histamins wird durch den Urin ausgeschieden.
Der Effekt dieser Histaminfreisetzung ist eine Initialzündung: Sofortige Erhöhung der Permeabilität der Kapillaren im geschädigten Gewebe. Sie äußert sich in einer Exsudation mit Blasenbildung und Plasmaverlust aus den stark nässenden, verbrannten

Hautflächen. Darüberhinaus kommt es zu Permeabilitätserhöhungen auch in Organen, die nicht von der Histaminwirkung unmittelbar betroffen wurden, wie in der Niere, deren Glomeruli für Moleküle bis zu einem Gewicht von 120 000 (normal 60 000) MG durchlässig werden. Auch die Lymphbahnen der Leber werden undicht. Die Schwellungsneigung des Gehirns nimmt vor allem bei Kindern zu und kann zum tödlichen Hirnödem führen.

Der Plasmaverlust kann als Folge des Verlusts von Wasser, Elektrolyten und Proteinen durch Exsudation nach außen und Ödembildung im Inneren des Organismus 50 % des Blutvolumens erreichen und Ursache eines schweren hypovolämischen Schocks werden. Das Blut wird eingedickt, der Hämatokrit steigt auf Werte von 60 % bis 70 %, die Fließeigenschaften des Blutes verschlechtern sich, die Herzarbeit wird erschwert. In und unter der verbrannten Haut entstehen Mikrozirkulationsstörungen (vgl. Abb. 1).

Im Gegensatz zum reversiblen hämorraghischen Schock, bei dem sich die periphere Durchblutung nach Beheben des Blutvolummangels normalisiert, bleibt beim Verbrennungsschock auch nach Auffüllen des Kreislaufs die Perfusion der geschädigten Haut gestört.

Störungen des Elektrolythaushaltes, des Proteinhaushaltes (Verlust von Albuminen) und des Energiehaushaltes durch Wasserverdunstung erweitern das Spektrum der mannigfachen Störungen.
Über die Freisetzung von Histamin und anderen Mediatoren wie Kininen und Prostaglandinen hinaus wird die Bildung giftiger Stoffwechselprodukte in der verbrannten Haut vermutet.
Im Lipidanteil der verbrannten Haut entstehen Substanzen, die in einer gesunden Haut nicht festzustellen sind, wie Derivate des Furans und des Benzols. Ihre Entstehung ist durch Oxyda-

tion und Zyklisierung mehrfach ungesättigter Fettsäuren oder Fettsäureester erklärbar. Versuche mit einer antitoxischen Therapie sind bisher in der Praxis ohne Erfolg geblieben. Auch die Freisetzung proteolytischer Enzyme in der verbrannten Haut wird diskutiert. Sie kann aber wegen der im Plasma enthaltenen hochwirksamen Enzyminhibitoren nicht nachgewiesen werden.

Ausgedehnte schwere Verbrennungen beeinträchtigen die körpereigene Abwehr durch Verminderung der Immunglobuline, die in der ersten Woche nach dem Trauma aus dem Serum fast vollständig verschwinden. Gleichzeitig wird die Phagozytose im retikuloendothelialen System beeinträchtigt. Aus der Verminderung der zellulären und humoralen Abwehr resultiert eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber bakteriellen Infektionen (28).

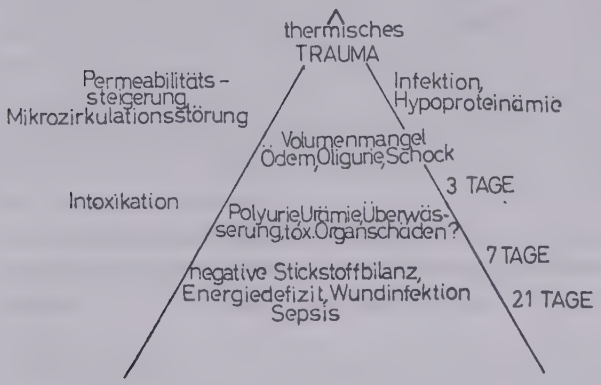


Abb. 1 verändert nach (28)

## 1.4. Die Verbrennungskrankheit

Gesetzmäßig entwickelt sich nach jeder schweren Verbrennung eine in mehreren Phasen ablaufende Allgemeinstörung, die

Verbrennungskrankheit. Sie beginnt mit der örtlichen und allgemeinen Permeabilitätstörung, der Ödemphase, die zwei bis drei Tage dauert. Danach beginnt die Rückresorption der in das Gewebe ausgetretenen Proteine und Elektrolyte. Sie ist häufig mit einer Polyurie verbunden.
In der 2. und 3. Woche treten die Wund- und Allgemeininfektion und die Erschöpfung der Energiereserven in den Vordergrund.

Typische Komplikationen der Verbrennungskrankheit sind Ulzerationen im Magen und Duodenum, unter Umständen mit tödlichen Blutungen.

### 1.4.1. Der Verbrennungstod

DUPUYTREN sah im Schmerz die Ursache des Verbrennungstodes, SONNENBURG (1877) in einer Vasomotorenlähmung, HEBRA und WELTI in einer Reflexlähmung des Herzens. Es wurden Sauerstoffmangel infolge Hämolyse, Atemlähmung (LESSER, 1890), Bluteindickung (BARDUC), Gerinnungsvorgänge mit Thrombosen und Embolien (SILBERMANN, 1890, KLEBS 1977) angeschuldigt. PONFICK und FRAENKEL hielten Hämolyse und Urämie als Folgen toxischer Schäden an Erythrozyten und Nierenparenchym für Todesursachen (zit. nach 27).

KOSLOWSKI (27) beschreibt eine große Zahl von Beweisen für das Vorliegen einer Vergiftung durch körpereigene Substanzen, doch legt er auch die Schwierigkeiten dar, die "Gifte" chemisch zu identifizieren.
Die Allgemeinstörungen in der initialen Phase der Verbrennung u.a. durch Histamin gilt heutzutage als allgemein anerkannt. Für eine Mitwirkung an sekundären Störungen bei der Verbrennungskrankheit fehlen noch sichere Belege.

### 1.4.2. Charakterisierung giftiger Substanzen bei der Verbrennung

BLÜTHGEN (zit. nach 27) vermutete eine unmittelbare Giftwirkung von Eiweißzerfallsprodukten auf die Organparenchyme.

Auch die Wirkung von Fettabbauprodukten (Acrolein) bei der Verbrennungsintoxikation ist diskutiert worden.

HUNTER et al. (21) konnten in artefiziell angelegten Lufttaschen unter verbrannten Hautpartien beim Hund Diffusate sammeln, von denen 10 - 12 mg/g Körpergewicht bei Ratten in 2 - 5 Stunden tödlich wirken. Wird dieses Toxin von $C^{14}$- markierten Tieren gewonnen und gesunden, nicht verbrannten Tieren in subkutane Lufttaschen injiziert, so erscheint es rasch in parenchymatösen Organen.
Der Toxizität von Autolysaten und erhitzten Proteinen wurde von GREUER (14) nachgegangen. Er hat besonders darauf hingewiesen, daß die Protolyse sich vor allem in den nicht koagulierten, unter der Nekrose liegenden Geweben abspielt.

BURRI und ALLGÖWER (6) untersuchten die toxische Wirkung steriler, verbrannter Haut bei Mäusen verschiedener Stämme. Homogenisate nativer, bei 250°C während 15 sec. verbrannter Haut wurden i.p. injiziert. Die Sterilisation der Substrate geschah mittels gespannten Äthylenoxids unter entsprechenden bakteriologischen Kontrollen. Die verbrannte Haut verursachte innerhalb 48 Stunden bei AFJD-Tieren eine Letalität von über 90 %, bei Carworth- und NMRJ-Mäusen mit wahrscheinlich höherer unspezifischer Resistenz eine solche von über 50 % bzw. 40 %. Die i.p. Injektion des sterilen Nativhauthomogenisats bewirkte eine Letalität von 3 % für die AFJD-Mäuse und von 0 % für die beiden anderen Stämme.

SHUN-SCHINELLA (57) untersuchten die Toxizität von nativer und verbrannter Haut. Die Isolation ihrer Hautdialysate und weiterer angeschlossener Fraktion geschah unter sterilen Bedingungen. Zusätzlich behandelten sie die einzelnen Fraktionen noch mit Antibiotika, was die Sterblichkeit bei mit Hautextrakten gespritzten, verbrühten Mäusen nicht herabsetzen konnte. Behandlung mit Extrakten sowohl aus nativer wie auch aus

verbrannter Haut führte zum Absterben der damit gespritzten Mäuse. Mittels Ammoniumsulfat-Fällung und Sephadex-Chromatographie konnten sie aus der Haut Fraktionen mit enzymatischer Aktivität isolieren. Auch diese Fraktionen wirkten toxisch auf die gewählten Versuchstiere.

ROSENTHAL et al. berichteten 1968 (39) von einem aus in vitro verbrannter menschlicher Haut isolierten "Burn-Toxin", welches gelöst in normalem menschlichem Serum, Rattenserum und verschiedenen Fraktionen von Rinderseren vorkommen soll.
Sie beschreiben das "Burn-Toxin" als eine Substanz ohne nachweisbare Prothrombin-Aktivität, ohne Interaktion mit mit Heperin, als hitzestabil, als unzerstörbar durch 70 %igen Alkohol. Sie berichteten weiterhin von einem hergestellten Antitoxin, das die tödliche Wirkung des "Burn-Toxin" aufheben soll.

ALLGÖWER et al. (1) sprachen einer unverbrannten, nativen, homogenisierten, lyophilisierten und mit Äthylenoxid sterilisierten Haut jegliche tödliche Wirkung bei intraperitonealer Injektion in gesunde Mäuse ab. Hingegen erreichten sie bei gleich behandelter, jedoch bei 150°C - 350°C verbrannter Haut toxische Symptome und eine hohe Sterblichkeit von Mäusen. Durch verbrannte Haut bei 250°C und 40 % verbrannter Körperoberfläche mit anschließender i.p. Injektion der aufgearbeiteten Haut erzielten sie 80 % Mortalität der Versuchstiere innerhalb der ersten 48 Stunden nach der Injektion. Bei 150°C oder 350°C verbrannter Haut zeigten sich leichte Unterschiede. Die größte Mortalität wurde bei 250°C erreicht. Sterile Homogenate nativer Haut bewirkten in keinem Fall toxische Effekte. Bei 250°C verbrannter Haut zeigte sich dagegen immer eine Wirkung, wenn auch von unterschiedlicher Intensität. Mögliche Interferenzen mit bakteriellen Endotoxinen wurden ebenfalls ausgeschlossen. Die Elektrolytzusammensetzung nativer und verbrannter Haut waren ähnlich, so daß ein toxischer Effekt

durch etwaige Elektrolytverschiebungen ausgeschlossen wurde. Obgleich Kollagen ein Hauptbestandteil der Haut ist, scheint hitze-denaturiertes Kollagen die Toxizität nicht zu bewirken. Im Gegenteil scheinen Hautaufarbeitungen mit geringem Kollagengehalt die Toxizität eher noch zu erhöhen. Weiterhin wird berichtet, daß eine Toxinisolierung aus männlicher Haut, die einen größeren Kollagengehalt besitzt, schwieriger ist als aus weiblicher Haut. Soweit scheint eine negative Korrelation zwischen Kollagen und Toxinbildung zu existieren. Das Toxin wird als nicht dialysierbar, nicht ultrafiltrierbar beschrieben, das mit 30 %igem Ammonium-Sulfat ausgefällt werden kann. Die toxische Wirkung könnte sowohl durch proteolytische Enzyme als auch durch Phospholipase und Lipid-Lösungsmittel zerstört werden. ALLGÖWER beschreibt das Toxin weiterhin als ein hochmolekulares Protein, das mit Lipoprotein-Partikeln assoziiert ist und das ein Membranbestandteil nativer Haut sein könnte.

Auch CHAET beschreibt ein Verbrennungstoxin und einen Mechanismus der Toxinbildung (7). Bei verbrühten Würmern (Phascolosoma Gouldii) fand er ein Toxin, das nicht durch Hitze per se gebildet wird, sondern indem ein nicht toxisches Molekül in ein toxisches umgewandelt wird und innerhalb 62 Stunden tödlich wirkt. Auch er beschreibt es als hitzefestes, nicht dialysierbares Molekül, welches mittels gesättigtem Ammonium-Sulfat ausgefällt wird. Er beschreibt das Toxin als normalen Bestandteil von "coelomic fluid cells", der bei Zellzerstörung durch Hitze, Nekrose oder hypotone Lösungen freigesetzt wird und seine tödlichen Wirkungen entfaltet. Werden dem Pfeilschwanzkrebs Limulus 0,002 - 0,003 ml des Toxins/g Körpergewicht injiziert, tötet es diesen innerhalb von 24 Stunden. Ohne einen Verlust an biologischer Aktivität konnte

er das Toxin über 10 Monate in gefrorenem Zustand aufbewahren.

CUENI (8) und SCHOENENBERGER et al. (52; 53) isolierten und charakterisierten ein Verbrennungstoxin aus Mäusehaut. Ihnen gelang durch kontrollierte Einwirkung thermischer Energie die so induzierte Entstehung eines spezifischen Verbrennungstoxins. Die toxische Wirkung ist hier an einen Lipid-Protein-Komplex mit geringem Aminozuckergehalt gebunden. Durch paralleles Aufarbeiten nativer Haut konnte eine, in Bezug auf die Lipid- und Protein-Komponente gleichartig aufgebaute, jedoch nach Angaben der Autoren nicht toxische Substanz mit bedeutend geringerem Molekulargewicht und kleinerer Dichte gewonnen werden. Bakterielle Kontamination wurde auch hier einwandfrei ausgeschlossen. Nach Ultrazentrifugation im Dichtegradienten zeigte sich für das "toxische" und das native Material in der Elektrophorese eine Proteinbande. Bei gleicher elektrischer Ladungsdichte unterscheidet sich der toxische Lipid-Protein-Komplex von seinem nichttoxischen Analogen durch größere Dichte und ein um ein Mehrfaches höheres Molekulargewicht. Beide Produkte enthalten 40 % Lipid und 60 % Protein mit 1 % Aminozucker. Beide Lipidanteile bestehen qualitativ und quantitativ identisch aus sechs verschiedenen Neutrallipiden, die Proteinanteile aus sechs verschiedenen Polypeptidketten enthalten. Das Molekulargewicht des nativen Komplexes liegt um $1 \times 10^5$, das des toxischen um $3 - 4 \times 10^6$. Die toxische Substanz wird als ein Tri- oder Tetramer eines in normaler Haut vorhandenen Membran-Lipid-Komplexes angesehen. Für die Toxizität ist die Toxin-Protein-Fraktion verantwortlich. Der Lipidanteil trägt auf unspezifische Weise zur Toxizität bei.

Die bei niedriger Gelkonzentration identische Mobilität weist auf eine übereinstimmende elektrische Ladung der "toxischen" und der "nativen" Fraktion hin. Der einzige Unterschied zwischen hitzeinduzierter, toxischer Substanz und der nichttoxischen

Kontrolle liegt im Auftreten einer neuen, höhermolekularen Komponente. Diese ist kontaminiert mit einer Verbindung von gleichem elektrophoretischem Verhalten wie das native Produkt. Daher und wegen der gleichen elektrischen Ladung beider Substanzen wird vermutet, daß das Toxin unter kontrollierter Einwirkung thermischer Energie durch Polymerisation einer in normaler Haut vorkommenden Vorstufe gebildet wird.

## 2.1. Eigene Beobachtungen und Meßwerte

### 2.1.1. Wahl geeigneter Untersuchungsmodelle

Die in der Literatur beschriebenen Toxizität-Test beziehen sich zum Großteil auf die Absterberate von Versuchsmäusen. Da die Toxine entweder intraperitonal, intravenös oder subautan appliziert wurden, wurden zumeist nur Allgemeinwirkungen beschrieben: ein Absterben der Versuchstiere bzw. das Überleben oder unruhiges Verhalten.

SCHÖLMERICH et al. beschrieben Leberstoffwechselveränderungen nach i.p. Injektion eines aus verbrannter Mäusehaut isolierten Verbrennungstoxins (49, 50). Bei jedem Versuch galt es, relativ große Mengen von Testsubstanz zu verwenden.

Vorliegend wurden zum Test der Hautprodukte weniger komplexe Systeme, die leichter zu handhaben waren und weniger Unsicherheitsfaktoren beinhalteten gewählt. Als weiteres Ziel der Wahl der Untersuchungsmodelle galt es, mit den isolierten Produkten zu haushalten.
Während beim Erythrozytenmodell als biologischem Modell die einzusetzende Testsubstanz bei 0,1 mg/ml Toxin lag, konnte schon mit einer Konzentration von 0,1 ug/ml Toxin ein Effekt an schwarzen Lipid-Bilayer-Membranen erzielt werden.
Als Ausgangssubstanz wurde Toxin- und Nativmaterial aus Mäusehaut benutzt, das nach der Methode von SCHOENENBERGER (51) isoliert worden war (vgl. Abb. 2).

2.1.2. Gewinnung des Verbrennungstoxins aus Mäusehaut

Die Häute für das Isolierungsverfahren wurden folgendermaßen präpariert:
Die Mäuse wurden durch Genickbruch getötet, die Haut rasiert, abgezogen und das subkutane Fettgewebe mit dem Skalpell entfernt. Nach grober Zerkleinerung mit der Schere und Tieffrieren auf -30°C wurde die Haut mit der Kugelmühle aufgeschlossen. Als Medium für die Aufschlüsse in der Kugelmühle diente eine Mischung aus 0,25 Saccharose und 0,1 m Phosphatpuffer pH 8,6 (1:20). Nach ca. 24-stündigem Mahlen erhält man ein Homogenisat, das die neutralsalzlöslichen Komponenten der Haut beinhaltet. Eine Differenzierung nach morphologischen Kriterien, wie etwa in epidermale und subepidermale Bestandteile wurde nicht vorgenommen, sondern stets die ganze Haut homogenisiert. Nach diesem Arbeitsgang wurde zentrifugiert (1 500 g, 30 min., 4°C), wonach sich drei verschiedene Phasen ergaben: am Meniskus zeigte sich eine Fettschicht, am Boden des Röhrchens befanden sich als Sediment die unlöslichen Hautbestandteile und dazwischen eine opaleszente, wässrige Phase. Letztere wurde anschließend durch Absaugen mit einer Spritze abgetrennt und zur Entfernung niedermolekularer Verbindungen gegen aqua bidest dialysiert (Visking Dialysierschlauch Nr. 27).
Zur Identifizierung der nieder- und hochmolekularen Eiweißbestandteile wurde ein präparativer Aufarbeitungsgang eingeschlagen, bei dem störende Begleitproteine durch Fällung mittels Ammoniumsulfat und Aceton entfernt wurden. Dies ist besonders beim nativen Extrakt wichtig, da er nur zu einem geringen Anteil Hautproteine enthält und der weitaus überwiegende Teil aus Serumproteinen besteht.
Für die Ammoniumsulfatfällung wurde das Lyophilisat des Neutralsalzextraktes in einer 1:1 - Mischung von Tyrode I und Tyrode II - Lösung aufgenommen und festes Ammoniumsulfat bis zu einer

Konzentration von 30 % zugegeben.
Das dabei ausfallende Eiweißpräzipitat wurde zur Entfernung des Ammoniumsulfats gegen Tyrode dialysiert. Ein Zusatz von Aceton zur dialysierten Lösung bis zu einer Konzentration von 50 % führte zu einer weiteren Abtrennung der gewünschten Proteinkomponenten von den Serumeiweißkörpern, die unter diesen Bedingungen in Lösung blieben. Das gewonnene Präzipitat wurde anschließend zentrifugiert, gewaschen, gegen Wasser dialysiert und gefriergetrocknet. Durch die Fällung mit Ammoniumsulfat und Aceton gelingt eine vollständige Abtrennung der Begleitproteine.
Die zurückbleibende, gereinigte Eiweißkomponente des Extraktes nativer Haut erweist sich als identisch mit dem niedermolekularen, schnellwandernden Protein des Extraktes verbrannter Haut (47). Es handelt sich um ein thermostabiles, lösliches Protein, das sowohl in nativer als auch in verbrannter Haut vorhanden ist. Von dieser Proteinkomponente sind aus verbrannter Haut wesentlich geringere Mengen extrahierbar.
Bei den hochmolekularen Eiweißbestandteilen ergibt sich das umgekehrte Bild, man findet wesentlich größere Anteile im Extrakt verbrannter Haut.

SCHMIDT (47, 48) zeigt, daß unter der Einwirkung thermischer Energie wahrscheinlich hochmolekulare Proteinkomplexe entstehen, in die das beschriebene niedermolekulare Protein mit eingebaut ist.

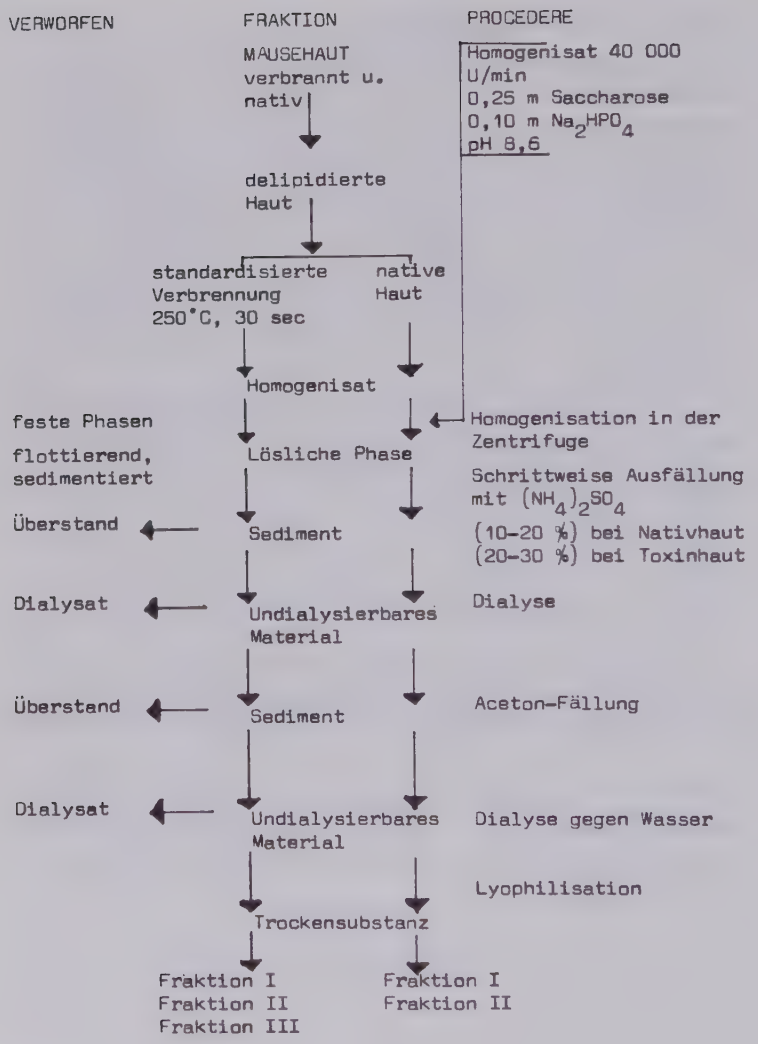


Abb. 2
Schema des Isolierungsverfahrens zur Gewinnung von Toxin aus verbrannter und der nichttoxischen Kontrolle aus unverbrannter Haut (verändert nach 51).

2.2. Eigenschaften des Verbrennungstoxins

| TOXIN | NATIVER PRECURSOR |
|---|---|
| Rosenthal: | |
| - Glykoprotein; $S_{w,20}$ = 2,75 | |
| - Peak im NMR Spektrum bei 2,0 Wellenlänge | |
| - wirkt spezifisch myocardtoxisch | |
| - Ø Prothrombin-Aktivität | |
| - Ø Interaktion mit Heparin | |
| - Hitzestabilität | |
| - Ø Zerstörung der Aktivität mit 70 %igem Alkohol | |
| Allgöwer: | |
| - Ø dialysierbar | |
| - Ø ultrafiltrierbar | |
| - Ausfällbarkeit mit 30 %igem Alkohol | |
| - spez. Zentrifugation bei 100 000 g | |
| - hochmolekulares Lipoprotein, 40 % Lipid; 60 % Protein (davon wahrscheinlich 1 % Aminozucker) | |
| Lipide: 6 verschiedene Neutrallipide | |
| Proteine: 6 verschiedene Polipeptidketten | |
| MG: 3-4 x $10^6$ | MG: 1 x $10^5$ |
| - Tri- oder Tetramer des nativen Precursors? | - identische elektrische Ladung mit "Toxin" |
| | - identisches elektrophoretisches Verhalten |

## 2.3. Humanerythrozyten als biologische Modellmembran

Vielfach wurde in der Literatur eine Hämolyse nach Verbrennung beschrieben (GOODPASTOR et al.; HILGENFELD et al.; zit. nach 27), wahrscheinlich nicht nur infolge Zerstörung von Erythrozyten durch unmittelbare Hitzeeinwirkung, sondern auch durch hämolysierende Enzyme.
Es ließen sich freies Hämoglobin und hämolysierende Substanzen in der Lymphe des Ductus thoracius nachweisen (NETSKY u. LEITER; zit. nach 27).
Weiterhin ist Anämie eine häufige Folge der Verbrennungen. Es tritt Sphärocytose mit Minderung der mechanischen und osmotischen Resistenz auf. Nach JAMES werden 43 % der Erythrozyten zerstört, nach RAKER und ROVIT jedoch nur 8 - 10 % (zit. nach 27). Zwischen dem Umfang der Gewebeschädigung und der Stärke der Hämoglobinämie soll eine direkte Beziehung bestehen.
Hypalbuminämie und relative Globulinvermehrung bei herabgesetztem Gesamteiweißwert fand STUCKE (zit. nach 27). Er stellte auch eine Gerinnungsverzögerung nach experimentellen Verbrennungen fest und wies auf die Beziehungen zwischen Trypsin, Antitrypsin und Plasmin hin.

In folgenden Hämolyseversuchen wurden dreimal gewaschene Erythrozyten als Modell einer biologischen Membran verwendet, um eine Wechselwirkung mit dem nativen Precursor aufzuzeigen.

## 2.4. Hämolyseversuche

### 2.4.1. Erythrozytenhämolyse durch unterschiedliche SDS-Konzentrationen (SDS = Natrium-Dodecylsulfat).

Um auszuschließen, daß mit SDS behandelte Nativ-Haut durch SDS allein für die Hämolyse verantwortlich ist, wurde nach einer SDS-Konzentration gesucht, die selbst nicht hämolytisch wirkt, jedoch eine Lösung von Nativmaterial im Aufar-

beitungsgang ermöglicht.

Als Testerythrozyten wurden frische Humanerythrozyten (Citratblut) verwendet. Das Blut wurde zentrifugiert, das Serum im Überstand mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Anschließend wurde dreimal mit isotonischer Kochsalzlösung gewaschen (vgl. Abb. 3).

Erythrozytenwaschung:

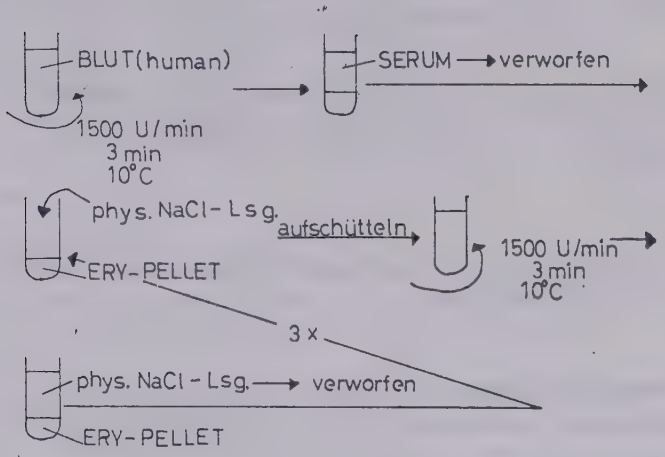


Abb. 3

Aus dem Erythrozyten-Pellet wurden nun jeweils 200 ul Erythrozytenkonzentrat zu zwei Lösungsansätzen SDS zugegeben.

Ansatz 1: 200 ul Erythrozytenkonzentrat in
2,5 ml SDS-Lösung

Ansatz 2: 200 ul Erythrozytenkonzentrat in
5 ml SDS-Lösung

Die erfolgte Hämolyse wurde in einem Aliquot des Überstandes photometrisch gemessen (vgl. Abb. 4).

Zuvor erfolgte eine 30-minütige Inkubation bei Zimmertemperatur (22°C).

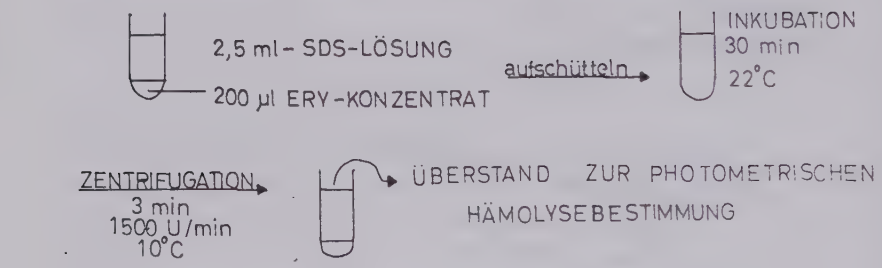


Abb. 4

Die Bestimmung des Hämoglobins erfolgte mit der Biochemica-Test-Kombination (Cyan-Hämiglobinmethode) nach BOEHRINGER, Mannheim. Es wurden stets Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Extinktion wurde bei 546 nm gemessen.

Ergebnis:

1. Verdünnungsreihe:

| % SDS-Konz. | ANSATZ I (2,5 ml) E | ANSATZ II (5 ml) E |
|---|---|---|
| $1 \cdot 10^{-3}$ | 0,159 | 0,0465 |
| $7,5 \cdot 10^{-3}$ | 0,136 | 0,0385 |
| $5 \cdot 10^{-3}$ | 0,112 | 0,0295 |
| $2,5 \cdot 10^{-3}$ | 0,025 | 0,0080 |
| $1 \cdot 10^{-3}$ | 0,000 | 0,0020 |
| $7,5 \cdot 10^{-4}$ | 0,0025 | 0,0000 |
| $5 \cdot 10^{-4}$ | 0,0025 | 0,0010 |
| $2,5 \cdot 10^{-4}$ | 0,000 | 0,0000 |
| $1 \cdot 10^{-4}$ | 0,000 | 0,0000 |

Tab. 1

2. Verdünnungsreihe:

| % SDS-Konz. | ANSATZ I (2,5 ml) E | ANSATZ II (5 ml) E |
|---|---|---|
| $1 \cdot 10^{-2}$ | 0,0935 | 0,0449 |
| $7,5 \cdot 10^{-3}$ | 0,076 | 0,0335 |
| $5 \cdot 10^{-3}$ | 0,0575 | 0,0280 |
| $2,5 \cdot 10^{-3}$ | 0,016 | 0,0120 |
| $1 \cdot 10^{-3}$ | 0,001 | 0,0020 |
| $7,5 \cdot 10^{-4}$ | 0,0025 | 0,0025 |
| $5 \cdot 10^{-4}$ | 0,0000 | 0,0000 |
| $2,5 \cdot 10^{-4}$ | 0,0000 | 0,0000 |
| $1 \cdot 10^{-4}$ | 0,0000 | 0,0000 |

Tab. 2

Für die folgenden Vergleichsmessungen mit delipidiertem Nativmaterial wurde nach obigen Messergebnissen Nr. 5 mit einer Konzentration von $1 \times 10^{-3}$ % SDS gewählt.

2.4.2. Erythrozytenhämolyse durch unterschiedliche Verbrennungstoxinkonzentrationen

Für die Hämolyseversuche mittels Nativ-Toxin wurden Konzentrationen von $7 \times 10^{-4}$ mg Nativ in 1 ml 0,9 %iger NaCl-Lösung bis 1 mg Nativ in 1 ml 0,9 %iger NaCl-Lösung genommen. Parallel dazu wurden die entsprechenden Konzentrationen in jeweils 1 ml $10^{-3}$ %iger SDS-Lösung untersucht.

Die Blutansatzlösung wurde gegenüber der SDS-Verdünnungsreihe verändert, so daß pro Verdünnungsansatz 100 ul-Erythrozyten-Pellet-Konzentrat pro ml verwendet wurden.
Die Hämolysemessung erfolgte ebenfalls nach der Biochemica-Test-Kombination von BOEHRINGER.

Ergebnisse:

Die Extinktionswerte sind Messungen nach 3-fach-Bestimmungen (vgl. Tab. 3 und Abb. 5-10):

| NATIV-Konz. in mg/ml | Fr. I E | Fr. I E | Fr. II E | Fr. II E | Fr. III E | Fr. III E |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | NaCl | SDS | NaCl | SDS | NaCl | SDS |
| 1,00 | 0,038 | 0,026 | 0,035 | 0,034 | 0,033 | 0,032 |
| 0,75 | 0,037 | 0,026 | 0,035 | 0,033 | 0,032 | 0,031 |
| 0,5 | 0,036 | 0,028 | 0,035 | 0,033 | 0,031 | 0,038 |
| 0,4 | 0,037 | 0,028 | 0,024 | 0,040 | 0,029 | 0,030 |
| 0,3 | 0,034 | 0,016 | 0,015 | 0,040 | 0,011 | 0,008 |
| 0,2 | 0,015 | 0,000 | 0,003 | 0,010 | 0,013 | 0,010 |
| 0,1 | 0,005 | 0,003 | 0,002 | 0,010 | 0,005 | 0,004 |
| 0,07 | 0,000 | 0,002 | 0,002 | 0,004 | 0,004 | 0,004 |
| 0,05 | 0,000 | 0,002 | 0,000 | 0,000 | 0,003 | 0,003 |
| 0,025 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 0,007 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 0,001 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 0,0007 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |

Tab. 3

Erythrozytenhämolyse durch Nativ-Fraktionen I-III des Aufarbeitungsganges N:

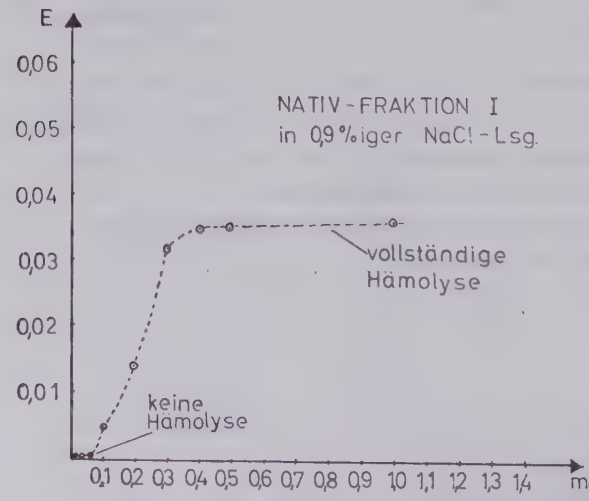


Abb. 5

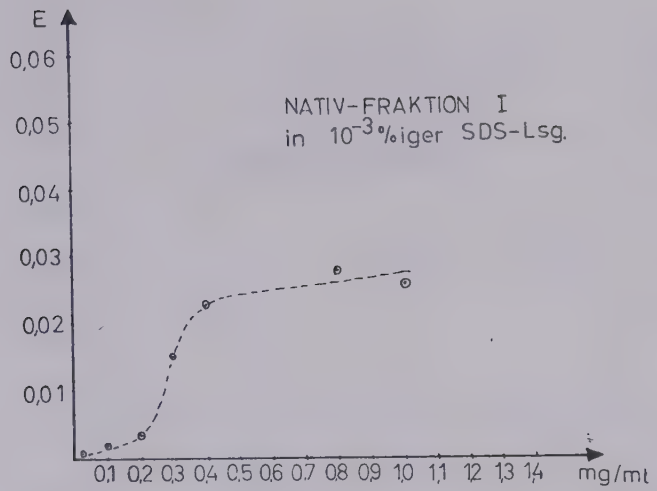
E
0,06
0,05
0,04
0,03
0,02
0,01
NATIV-FRAKTION I
in $10^{-3}$%iger SDS-Lsg.
0,1 0,2 0,3 0,4 0,5 0,6 0,7 0,8 0,9 1,0 1,1 1,2 1,3 1,4
mg/ml

Abb. 6

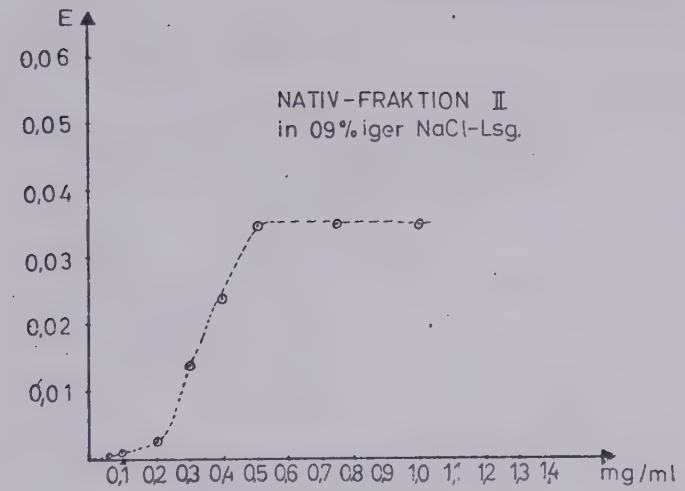
E
0,06
0,05
0,04
0,03
0,02
0,01
NATIV-FRAKTION II
in 0,9%iger NaCl-Lsg.
0,1 0,2 0,3 0,4 0,5 0,6 0,7 0,8 0,9 1,0 1,1 1,2 1,3 1,4
mg/ml

Abb. 7

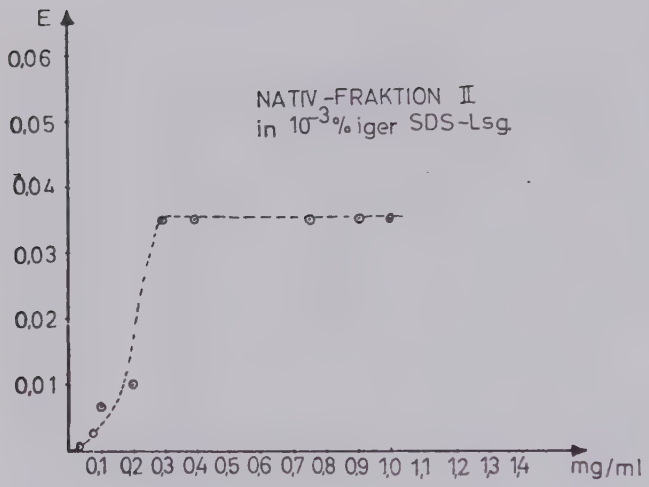
E
0,06
0,05
0,04
0,03
0,02
0,01
NATIV-FRAKTION II
in $10^{-3}$% iger SDS-Lsg.
0,1 0,2 0,3 0,4 0,5 0,6 0,7 0,8 0,9 1,0 1,1 1,2 1,3 1,4
mg/ml

Abb. 8

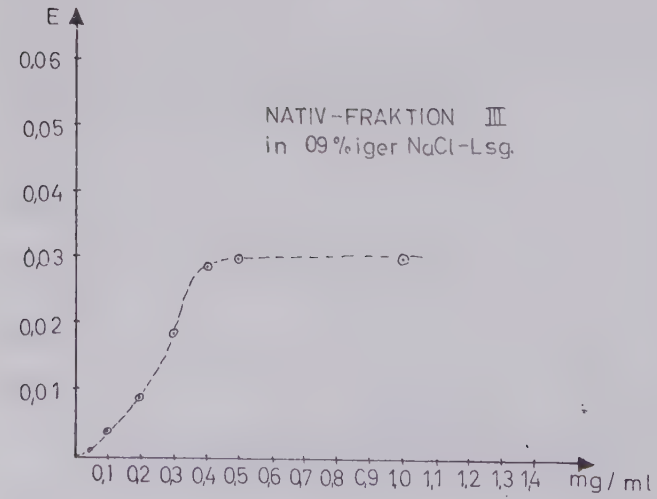
E
0,06
0,05
0,04
0,03
0,02
0,01
NATIV-FRAKTION III
in 0,9 %iger NaCl-Lsg.
0,1 0,2 0,3 0,4 0,5 0,6 0,7 0,8 0,9 1,0 1,1 1,2 1,3 1,4
mg/ml

Abb. 9

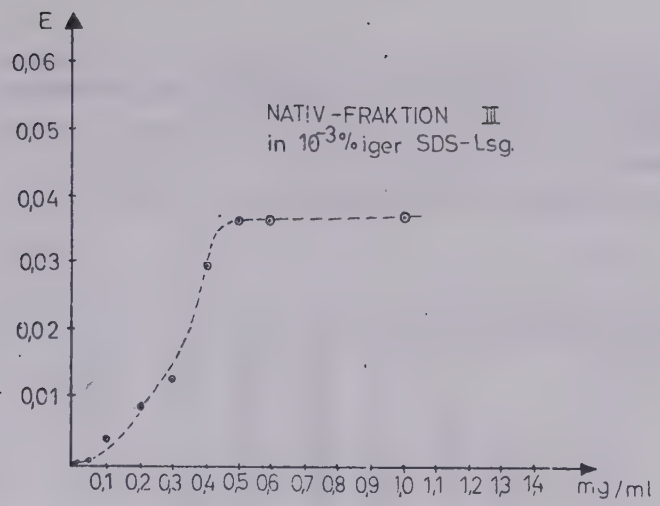


Abb. 10

Ergebnisse der Hämolyseversuche:
Im folgenden werden die Grenzkonzentrationen für 50 %ige Hämolyse der Erythrozyten eines 100 ul Ery-Konzentrates aus dem Pellet aufgeführt:

| 50 % Hämolyse | bei 0,9 %iger NaCl-Lsg. | bei $10^{-3}$%iger SDS-Lsg. |
|---|---|---|
| Nativ-Fr. I mg/ml | 0,22 | 0,28 |
| Nativ-Fr II mg/ml | 0,34 | 0,25 |
| Nativ-Fr III mg/ml | 0,27 | 0,32 |

Tab. 4

2.4.3. Hämatokritbestimmung nach Wechselwirkung mit Verbrennungstoxin

im folgenden wird die Wechselwirkung des Nativ-Toxins mit einem Blut-NaCl-Gemisch mittels Hämatokritmessung untersucht.

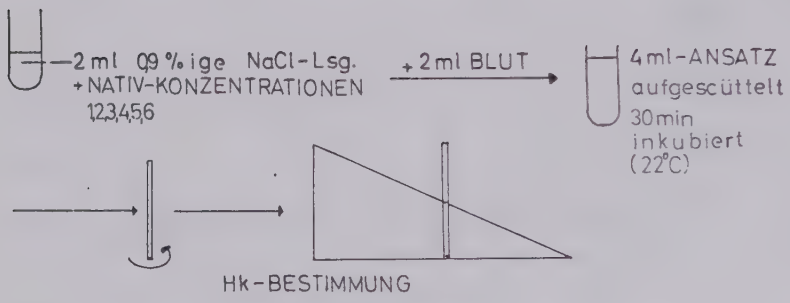


Abb. 11

Zu einem Blut-NaCl-Ansatz werden jeweils die Konzentrationen 1-6 an Nativ-Toxin hinzugegeben und nach Aufschütteln für 30 Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert. Anschließend wurde mittels handelsüblicher Hämatokrit-Kapillare nach Zentrifugation eine Hämatokritbestimmung vorgenommen. Der Hämatokritwert des Frischblutes betrug 55 %. Der Hämatokritwert des Blut-NaCl-Ansatzes ohne Nativ-Toxin (Kontrolle) betrug 25 %.

| Nr. | Nativ-Konz. in mg/ml | Hk (5-fach % BEST.) | erhaltene Erys in % | Hämolyse sichtbar |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 1,0 | 15,0 | 60 | + |
| 2 | 0,75 | 17,5 | 70 | + |
| 3 | 0,5 | 19,5 | 78 | + |
| 4 | 0,25 | 23,5 | 94 | +/- |
| 5 | 0,1 | 24,0 | 96 | - |
| 6 | 0,01 | 24,5 | 98 | - |
| K1 | 0,0 | 25,0 | 100 | - |
| K2 | 0,0 | 25,0 | 100 | - |

Tab. 5

Folgendes Schaubild zeigt die bei den jeweiligen Nativ-Toxin-Konzentrationen (von 0,01-1 mg/ml) gemessenen Hämatokritwerte sowie den Prozentsatz unversehrter Erythrozyten des Meßansatzes:

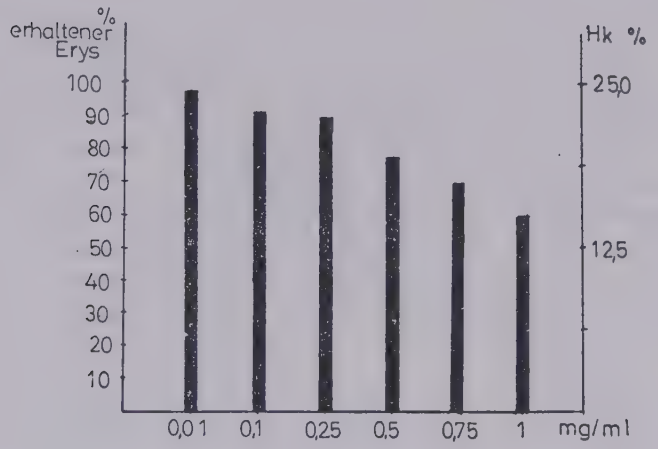


Abb. 12

Bei einer Konzentration von 1 mg/ml Nativ-Toxin (Precursor) sind nur noch 60 % der Erythrozyten des Testansatzes erhalten. Halbiert man nun die Nativ-Toxin-Konzentration (0,5 mg/ml), so bleiben 78 % der Erythrozyten erhalten. Keine sichtbare Hämolyse mehr ergibt sich bei einer Nativ-Toxin-Konzentration von 0,1 mg/ml, wobei 98 % der Erythrozyten erhalten bleiben (vgl. Abb. 12).

### 2.4.4. $Na^+$- und $K^+$-Konzentration unter Wirkung von Verbrennungstoxin

#### 2.4.4.1. $Na^+$-Konzentration

Versuchsdurchführung (vgl. Abb. 13):

Zweimal 2 ml Blut wurden zentrifugiert. Das Serum wurde verworfen. Der Erythrozytenniederschlag wurde dreimal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. Zur Kontrolle wurde eine Hämolyse mittels 2 ml aqau bidest ohne Nativ-Toxin vorgenommen und die $Na^+$-Konzentration im Überstand bestimmt.
Im Versuchsgang mit Nativ-Toxin wurde den Erythrozyten Konzentrationen von 1 mg/ml bis 0,33 mg/ml in 1 %iger NaCl-Lösung angeboten. Anschließend erfolgte eine Inkubation bei 22°C für 30 Minuten. Vor der Hämolyse mittels 2 ml aqua bidest wurde der Erythrozyten-Toxin-NaCl-Ansatz zweimal mit natriumfreiem Puffer gewaschen. Im Überstand wurde dann eine $Na^+$-Bestimmung mittels Flammenphotometrie durchgeführt. Eine entsprechende Durchführung, jedoch ohne Waschung mit natriumfreiem Puffer, erfolgte für die $K^+$-Bestimmung.

Ziel dieser Suche war es herauszufinden, ob das Nativ-Toxin "Löcher" in die Erythrozytenmembran "schlägt", die je nach Größe selektiv relativ kleine Ionen wie $Na^+$ bzw. $K^+$ durchlassen oder gleich relativ große Defekte setzen, die dem im Vergleich zum $Na^+$- bzw. $K^+$-Ion recht großen Hämoglobinmolekül Durchtritt durch die Erythrozytenwand gewährt.
Um den Erythrozyten genügend $Na^+$-Ionen im Außenmedium anzubieten, wurden sie mit einer 1 %igen NaCl-Lösung 30 Minuten lang inkubiert. Es wurde keine höhere Konzentration gewählt, um einer Veränderung der Erythrozytenmorphologie in die Stechapfelform (Echinocyt), wie sie nach Verbringen in hypertone Salzlösungen auftritt, vorzubeugen.

**Versuchsdurchführung zur Natriummessung:**

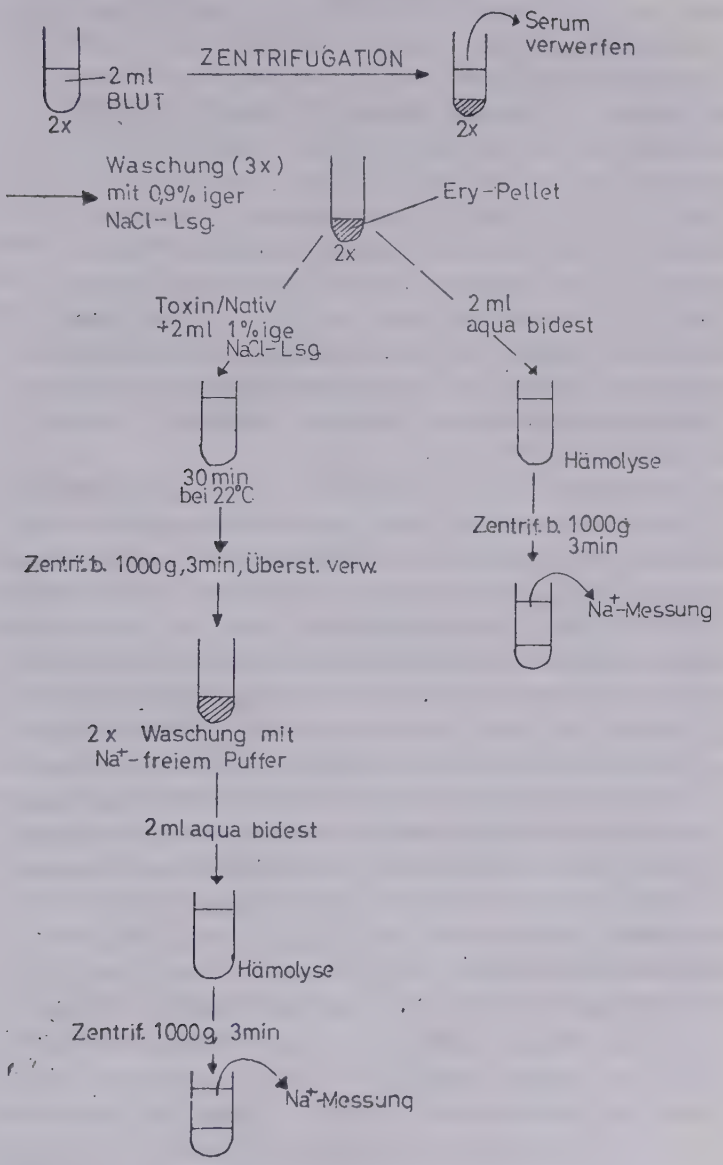


Abb. 13

Diese in vitro Versuche stellen eine Vereinfachung der in vivo bestehenden physiologischen Bedingungen dar. Wurde den osmotischen Verhältnissen durch Verwendung einer 1%igen NaCl-Lösung einigermaßen Rechnung getragen, so blieben im in vitro Experiment die Wirkungen des onkotischen Druckes durch die in vivo vorhandenen Plasmaproteine unberücksichtigt. In vivo ist die Eiweißkonzentration im Erythrozyten höher, die der kleinmolekularen Stoffe niedriger als im Plasma. Die osmotische Wirkung der höheren Eiweißkonzentration im Erythrozyten wird durch die gegenüber dem Plasma niedrigere Konzentration kleinmolekularer Stoffe osmotisch so weit kompensiert, daß ein geringer, eben für den normalen Turgor des Erythrozyten ausreichender Überdruck im Innern bestehen bleibt.

$Na^+$ und $K^+$ werden aktiv durch die Membran transportiert, $Na^+$ aus der Zelle hinaus und $K^+$ in sie hinein. Wegen der für die einzelnen Ionensorten stark unterschiedlichen, aber prinzpiell bestehenden Durchlässigkeit der Erythrozytenmembran für kleinmolekulare Stoffe führt eine Hemmung des aktiven Ionentransportes zum Ausgleich der Konzentrationsunterschiede der Ionen und damit zum Wirksamwerden des vollen kolloidosmotischen Druckgradienten (auf Grund des weiterbestehenden höheren intrazellulären Gehaltes an Eiweißkörpern). Bei geringer Hypotonie der extrazellulären Flüssigkeit schwellen Erythrozyten lediglich an und nähern sich der Kugelform (Sphärozyten). Im hypertonischen Medium verlieren die Zellen Wasser, und es kommt durch Faltungen der Membran zur sog. Stechapfelform.

Bringt man Erythrozyten in eine isotonische Lösung von gut membrangängigen Stoffen wie Z.B. Harnstoff, dann kommt es ebenfalls zur osmotischen Hämolyse. Der Harnstoff verteilt sich gleichmäßig im Erythrozyten und im Suspensionsmedium. Da für die physiologischen Inhaltsstoffe der Erythrozyten die Membran den freien Austritt verhindert, nimmt der intrazelluläre osmotische Druck um den Betrag des einströmenden Harnstoffes

gegenüber dem Suspensionsmedium zu. Wasser strömt ein und führt zur mechanischen Zerstörung der Membran.
Auch können Lipoidlösungsmittel wie Chloroform, Äther und ähnliches durch Herauslösen der Lipoidanteile der Membran zu "Lecks" und damit zur Hämolyse führen. Die hämolysierende Wirkung der Seifen und Detergentien beruht auf der Herabsetzung der Oberflächenspannung zwischen der wässrigen und der Lipoidphase der Membran. Die Lipoide werden emulgiert und aus der Membran herausgehoben. Infolge der dabei entstehenden Membranlücken hämolysieren die Zellen.
Eine Fragestellung zu diesen Versuchen lautete, ob das Nativ-Toxin ähnlich wie der Harnstoff auf die Erythrozyten einwirkt und zur osmotischen Hämolyse führt, oder ob der Wirkungsmechanismus mehr in Richtung des Angriffs von Lipoidlösungsmitteln wie z.B. Chloroform zu suchen ist. Durch Herauslösen von Lipoidanteilen der Membran würde es zu "Lecks" und damit zur Hämolyse kommen. Würden Löcher durch das Nativ-Toxin in die Erythrozytenwand "geschlagen" werden, so könnte man annehmen, daß das Überangebot von $Na^+$ im Außenmedium zu einem $Na^+$-Einstrom in den Erythrozyt führt. Der $Na^+$-Gehalt im Erythrozyt müßte schließlich größer werden. Reaktiv wäre dann ein Wassereinstrom zu fordern, der zu einer Volumenvergrößerung des Erythrozyten führt.
In den vorliegenden Versuchen ergibt sich eine Abnahme der $Na^+$-Konzentration im Hämolysat mit fallender Nativ-Toxin-Konzentration. Die Unterschiede sind jedoch letztlich zu gering, um gegenüber den Kontrollen einen statistisch signifikanten Effekt herausarbeiten zu können. Die Messung von $Na^+$ im Außenmedium nach Einwirkung von Nativ-Toxin bei einer Konzentration von 1 mg/ml ergab 5,5 mval./l. Im Kontrollversuch ohne Toxin konnte im Außenmedium eine $Na^+$-Konzentration von nur 3,8 mval/l gemessen werden.

2.4.4.2. $K^+$-Konzentration

Die Messung von $K^+$ im Außenmedium ergab nach Einwirkung von Nativ-Toxin bei 1 mg/ml eine $K^+$-Konzentration von 9,5 mval/l. Die Messung der $K^+$-Konzentration im Kontrollversuch ohne Toxin ergab hier 4,8 mval/l.

| NATIV-Konz. in mg/ml | $Na^+$ in mval/l (5 Proben) | $K^+$ in mval/l (5 Proben) |
|---|---|---|
| 1,00 | 5,5 | 9,5 |
| 0,75 | 5,3 | 7,3 |
| 0,50 | 5,2 | 8,0 |
| 0,25 | 4,5 | 9,1 |
| 0,10 | 4,5 | 7,8 |
| 0,033 | 4,2 | 7,8 |
| 0,00 | 3,8 | 4,8 |

Tab. 6

2.5. Der Lipid-Bilayer (Black Membrane) als Modell einer künstlichen Membran

Die Schädigung des Hautorgans bei der Verbrennung führt wie jede Organschädigung zu einer je nach Ausmaß der Traumatisierung abgestuften Beeinträchtigung der spezifischen Organfunktionen. Im Falle der Haut sind dies zunächst Schrankenfunktionen, deren Ausfall zu einem kontinuierlichen Flüssigkeitsverlust und als Folge der Wasserverdampfung zu einem Energiedefizit führt. Die Zerstörung der Diffusionsschranken, d.h. der zellulären und subzellulären Kompartimentierung, läßt dazu noch das osmotische Gleichgewicht zusammenbrechen, was sich in einer ausgeprägten Ödemneigung zu erkennen gibt (47).

Zu jedem biologischen System vom Einzeller bis zum hochentwickel-

ten Säuger ist ein geregelter und sinnvoller Ablauf der Lebensvorgänge ohne Kompartimentierung der subzellulären Struktur undenkbar. Fallen diese natürlichen Schranken oder werden sie durch Noxen beeinträchtigt, so folgen zwangsläufig Störungen der Homöostase mit mehr oder weniger großen Folgestörungen im Gesamtorganismus.

Am Beispiel des Verbrennungstoxins ließen sich ebenfalls Membranwirkungen im biologischen System finden. SCHMIDT (47) berichtet bei toxinbehandelten Ratten von einer vakuoligen Aufhellung der Mitochondrien mit Auflösung der inneren Mitochondrienmembran sowie einer Verbreiterung des endoplasmatischen Retikulums von Hepatocyten.
Die primäre Ursache der strukturellen und funktionellen Veränderungen ist durch Experimente am ganzen Tier oder am ganzen Organ kaum zu ermitteln, sondern erfordert wesentlich weniger komplexe Testsysteme.
Ein Modell einer Kompartimentierung stellt das im folgenden beschriebene System dar. Mit Hilfe eines Lipid-Bilayers (künstliche Membran; black membrane) als einem Modell einer biologischen Membran wird die Wechselwirkung aus Mäusehaut isolierter Bestandteile untersucht.
Folgende Probleme sollen am Membranmodell erörtert werden:

1. Besteht eine Wechselwirkung zwischen Nativ-Toxin und der Black Membrane?
2. Stellt der Lipid-Bilayer ein Testsystem für den Reinheitsgrad der im Trennungsgang aufgearbeiteten Substanzen dar?
3. Kann der Lipid-Bilayer als Modell für einen möglichen Wirkungsmechanismus des Toxins verwendet werden?
4. Können Rückschlüsse aus der Wechselwirkung des Toxins mit einer standardisierten Modellmembran bekannter Zusammensetzung auf die chemischen und physikalischen Eigenschaften des Toxins gezogen werden?

Lipid-Bilayer erwiesen sich in den vergangenen Jahren als äußerst brauchbares Modell einer natürlichen Membran.
Die Diskussion um den Lipid-Bilayer rankt sich um Probleme der Art der Zusammensetzung, der Dicke der Membran, ihrer Fläche, Kapazität, Ionendurchlässigkeit und spezifischer Transportsysteme.
BENZ und GISIN (2) untersuchten eine große Anzahl von Membranzusammensetzungen auf den Einfluß für den Ionentransport durch die Membran. Sie formten Membrane aus verschiedenen Phosphatidylcholinen, Monoglyceriden und Phospahtidyläthanolaminen, gelöst in Dekan. Bei Monoglyceriden untersuchten sie den Lösungsmitteleinfluß in der homologen Reihe von n-Oktan bis n-Hexadekan. Unter dem Einfluß unterschiedlicher Lösungsmittel änderte sich die Dicke der Monooleinmembran von 4,9 bis 2,5 nm.
FETTIPLACE et al (13) zeigten ebenfalls die strenge Abhängigkeit des Hydrocarbon-Lösungsmittels bei der Membranbildung für die Eigenschaften der Membran wie Kapazität, Dicke und molekulare Zusammensetzung. Sie formten n-Hexan-Membrane, die kein Lösungsmittel enthielten mit einer elektrischen Kapazität von 0,6 uF/$cm^2$ und einer Hydrocarbon-Dicke von ca. 31 Å. Im Gegensatz dazu haben biologische Membrane eine Kapazität, die näher an 1 uF/$cm^2$ liegt. Man nimmt an, daß in diesen Membranen die Hydrocarbon-Region dünner sein müsse als in "lipid leaflets". U.a. geben FETTIPLACE et al. für eine Kapazität von 0,383 uF/$cm^2$ bei einer Dicke $\delta_e$ des "hydrocarbon core" von 48 Å und einer Fläche von 39,5 $A^2$ pro Molekül an. Die Kapazität der Membran wurde bei 550 Hz gemessen und die Dicke $\delta_e$ des "hydrocarbon core" nach folgender Gleichung berechnet:

$$C = \frac{\varepsilon \; A}{4\pi \delta_e}$$

wobei A die Membranfläche darstellt, $\varepsilon$ die Dieelektrizitäts-

konstante des Kohlenwasserstoffs (LANDOLT, zit. nach FETTIPLACE (13)). Weiterhin beschreibt FETTIPLACE ebenda ein Altern der Membran. Am Beispiel einer Lecithin-Hexadekan-Membran in 0,1 N NaCl-Lösung zeigte er den Verlauf der Kapazitätsänderung in der Zeit. Während sich bei der Lecithin-Hexadekan-Membran die Kapazität innerhalb der ersten 50 Minuten nach Bildung der Membran nicht wesentlich ändert (von 2 bis 6 $pF \cdot 10^{-3}$), ändert sich die Kapazität in weiteren 50 Minuten von 6 bis 40 $pF \cdot 10^{-3}$. Die "Alterung" der Lipid-Membran, die je nach Membranzusammensetzung anders ist, ist bei dieser Membran in den ersten 30 Minuten geringfügig verändert (nämlich von 2 auf 3 $pF \cdot 10^{-3}$).

### 2.5.1. Vergleich zwischen biologischer und künstlicher Membran

Für Säugetier-Erythrozyten sind die Membraneigenschaften recht gut bekannt, und die spezifischen Kapazitäten für verschiedene Speciesarten von Erythrozyten sind sehr ähnlich. Es wird angenommen, daß in biologischen Membranen im Gegensatz zu Lipid-Bilayern "polar pores" bestehen, die die Dieelektrizitätskonstante der Membran anheben und so verantwortlich für die hohe Kapazität sind.

### 2.5.2. Material und Methoden

In vielen Arbeiten wurden Wechselwirkungen an künstlichen Membranen von Substanzen wie Hemocyanin (32), Amphotericin B (11), Cardiotoxin (60), Escherichia-Coli-Matrix-Protein (46), Gramicidin (30, 45), Cholera-Toxin (59) und Valinomycin (3, 12, 26, 30, 58) beschrieben.
In dieser Arbeit wurde eine Membran aus ox. Cholesterin/n-Dekan gewählt, um die Wechselwirkung eines aus Mäusehaut isolierten Verbrennungstoxins sowie dessen nativen Precursors zu prüfen.

Schwarze Lipid-Membrane wurden aus oxidiertem 1 %igen Cholesterin/n-Dekan-Gemisch gebildet. Die Membranlösung wurde mittels einer Hämatokrit-Kapillare auf ein 1 mm großes Loch in einer Teflon-Doppelkammer gebracht. Ihr Schwarzwerden wurde durch ein Sichtfenster mittels Beobachtungsmikroskop kontrolliert (vgl. Abb. 14). In jeder Kammerhälfte befand sich ein gleich hoher Stand an Elektrolytflüssigkeit (1 m NaCl oder 1 m KCl), die mittels Tris-HCl-Puffer auf einen pH-Wert von 7,4 gebracht wurde. Die Strommessung erfolgte mittels selbst angefertigter Silberchloridelektroden über ein Elektrometer (KEITHLEY 610 C). Mittels eines beheizbaren Metallblocks, der die Teflondoppelkammern u-förmig umgab, wurde die Temperatur der Elektrolytlösung während aller Versuche bei konstant 25°C gehalten. Ein Transformator brachte die Meßspannung auf 10 mV. Zusätzlich erfolgte die Aufzeichnung der Strommessung durch einen x,y-Schreiber. Um die Teflonkammer und die Elektroden wurde ein Faraday'scher Käfig angebracht. Das ganze Meßsystem wurde vibrationsfrei auf einem aufblasbaren Gummi-Schlauch aufgestellt.

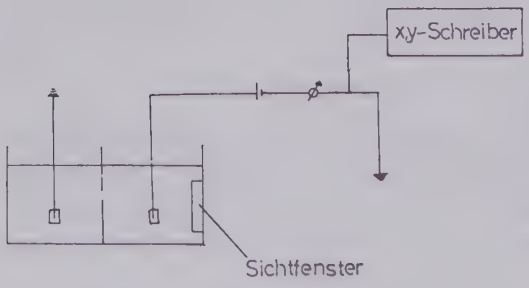


Abb. 14

## 2.6. Valinomycin als positive Kontrolle

BENZ et al. (3) beschrieben einen valinomycinübermittelten Ionentransport durch neutrale Lipid-Membrane.
Sie zeigten, daß bei großer Membranfläche (0,1 $cm^2$) einer Dierucoyllecithin-Membran ein linearer Leitfähigkeitsanstieg bis zur Sättigung innerhalb der ersten 10 Minuten erfolgt, bei einer Membranfläche von $5 \cdot 10^{-3} cm^2$ wird eine Sättigung erst nach 35 bis 40 Minuten erreicht.

In dieser Arbeit wurde eine geringe Konzentration an Valinomycin auf eine Seite der Membran gebracht, die den schwarzen Zustand schon erreicht hatte. Es wurde die Membranleitfähigkeit geprüft, indem bei konstanter Spannung (10 mV) der Stromverlauf gegen die Zeit gemessen wurde.
Die Membranfläche in Messungen dieser Arbeit wurde mit $9{,}42 \cdot 10^{-3} cm^2$ berechnet. Ohne Valinomycin wurde nur die Grundleitfähigkeit der Membran in Gegenwart von KCl-Lösung gemessen. Ein signifikanter Stromanstieg in der Zeit konnte ohne Valinomycin nicht beobachtet werden. Bei BENZ (ebenda) wächst nach Zugabe von Valinomycin die Stromstärke an, bis schließlich eine stationäre Stromhöhe erreicht wird. Die Zeit, in der dieser steady state erreicht wird, ist abhängig von der Temperatur, der Kettenlänge der Lipide und besonders von der Membranfläche. Mit Lecithin-Membranen mit einer Fläche von 0,1 $cm^2$ wurde der steady state nach ungefähr 50 Minuten erreicht. Diese Zeitspanne verkürzte sich auf 10 Minuten bei einer Membranfläche von $5 \cdot 10^{-3}$ $cm^2$. Die Zeitspanne zum Erreichen des steady state nahm mit wachsender Kettenlänge der Lipid-Moleküle zu, während sie mit steigender Temperatur abnahm.

Da die Zeiteffekte durch die Kinetik des Ionentransports in Gegenwart von Valinomycin in der Größenordnung von $10^{-3}$ Sekunden geschehen, kann angenommen werden, daß die Zeitverläufe

obiger Experimente verantwortlich sind für den Transport von Valinomycin aus der wässrigen Phase in das Membrangefüge. Der Mechanismus des valinomycininduzierten $K^+$-Transports basiert auf dem "Eyring-Modell" (29). Dieses Modell nimmt an, daß die Transportmoleküle in der "membrane interface" eingelagert sind. Der Ionentransport von der wässrigen Phase durch die Innenschicht der Membran wird bewerkstelligt durch eine chemische Reaktion freier ungeladener Carrier-Moleküle S von der Membran und Ionen $M^+$ von der wässrigen Phase. Diese heterogene Reaktion wird mittels Rekombination und Dissoziation folgendermaßen beschrieben:

$$M^+_{(\text{wässrig})} + S_{(\text{Membran})} \underset{k_D}{\overset{k_R}{\rightleftharpoons}} MS^+_{(\text{Membran})}$$

wobei

$k_R$ = Rekombinationsrate
$k_D$ = Dissoziationskonstante

Die geladenen $MS^+$-Komplexe, von denen angenommen wird, daß sie die einzigen Ionen-Carrier innerhalb der Membran sind, mögen anwachsen mit einer $k_{MS}$-Konstante, deren Größe über der Grenzenergie des Membraninnern liegt. Dasselbe gilt für freie Carrier S-Moleküle. Mittels dieser vier Konstanten und der Gesamtzahl an Carrier-Molekülen $N_0$ (Mole/$cm^2$) in der Membran kann das ganze Transportmodell beschrieben werden. Die beobachteten Effekte können als Abhängigkeit der Kombinationsrate von der Membranstruktur gedeutet werden.
Weiterhin erstrecken sich die Versuche jeweils über eine große Zeitspanne. In dieser Zeit muß ein "Altern" der Membran angenommen werden. Der Grund hierfür ist der "Dekan-Effekt". Er besteht in einem Schwund an Dekan, das dem Membranaufbau nunmehr nicht zur vollen Verfügung steht.
In dieser Arbeit werden im Verlauf der Untersuchungen die Be-

dingungen zur Formung von künstlichen Membranen nicht oder nur geringfügig geändert.
In der zahlreichen Membranliteratur werden Substanzen wie Valinomycin et cet. verwendet, um Eigenschaften verschiedener künstlicher Membrane zu erkunden. Hier nun werden die Membranbedingungen standardisiert, um durch Zugabe von bekannten und unbekannten Substanzen durch Wechselwirkung an der Membran Rückschlüsse auf die Testsubstanzen zu ziehen.

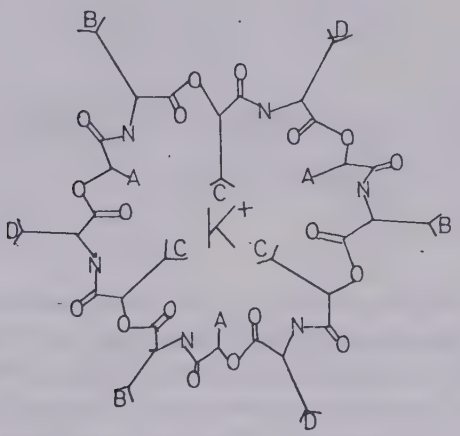


Abb. 15: Struktur eines Valinomycin-$K^+$-Komplexes, wobei
A = L-Lactat C = D-Hydroxyisovalerat
B = L-Valin D = D-Valin ist.

Die Membran besteht in allen Versuchen aus einem Gemisch von 1 %igem ox. Cholesterin in n-Dekan. Zum Membranlösungsansatz wurde bis zu 10 % des Ansatzes n-Butanol hinzugegeben. Die Membranfläche beträgt $9{,}42 \cdot 10^{-3} cm^2$. Im Leerversuch, also ohne Wirksubstanzen, können die Membrane über wenigstens zwei Stunden stabil gehalten werden. Gemessen wird bei einer angelegten Spannung von 10 mV. Die Elektrolyttemperatur beträgt durchgehend 25°C. Es wird 1-m-NaCl- oder 1-m-KCl-Lösung verwendet. Es wird stets an optisch schwarzen Membranen gemessen.

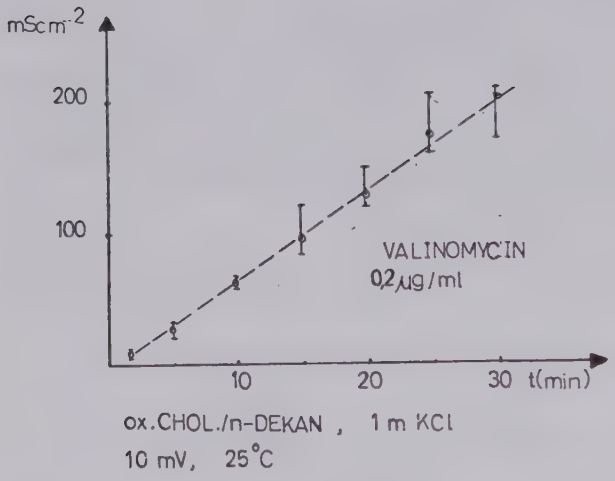


Abb. 16

Im Falle von Valinomycin beträgt die Endkonzentration an der Membran im KCl- sowie im NaCl-Elektrolyt 0,2 ug/ml (vgl. Abb. 17). Die Leitfähigkeit der Membran erweist sich im Falle von KCl um ein Vielfaches größer als die im NaCl-Elektrolyt (vgl. Abb. 16). Es werden im KCl-Milieu Leitfähigkeiten von 0,2 bis knapp 200 mS/cm$^2$ gemessen. Bei der Wahl von NaCl als Elektrolyt zeigt sich hingegen ein linearer Leitfähigkeitsanstieg von 0,1 bis 0,8 mS/cm$^2$.

Da Spuren von $K^+$-Ionen (nämlich 0,01 Prozent) in dem uns zur Verfügung stehenden NaCl pro analysi noch vorhanden sind, können sowohl der durch Valinomycin spezifische $K^+$-Transport durch Lipid-Membrane als auch die Wirksamkeit des Membranmodells bestätigt werden.

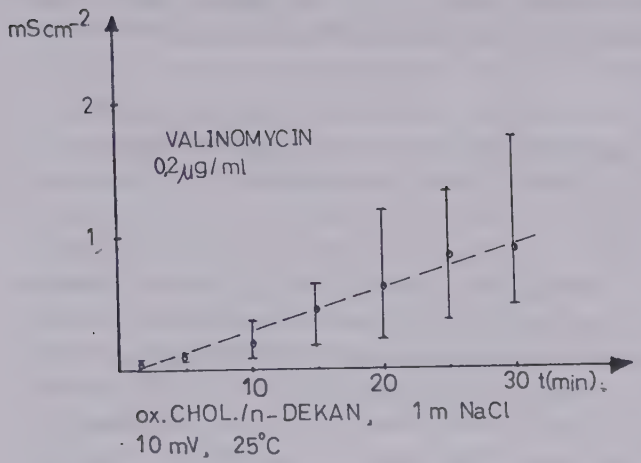


Abb. 17

Die Wirksamkeit von Valinomycin im NaCl-Elektrolyt zeigt immer noch eine deutlich signifikant erhöhte Leitfähigkeit gegenüber dem "Altern" der schwarzen Membran durch den Dekan-Effekt. Ein Übergang der Leitfähigkeitsänderung in einen Steady-State-Zustand zeigt sich bei der verwendeteten ox. Cholesterin/n-Dekan-Membran innerhalb der ersten 30 Minuten nicht. Die Messungen, denen mindestens 5 schwarze Membrane zugrunde liegen, werden nach 30 Minuten abgebrochen.

## 2.7. Wechselwirkung der ox. Cholesterin/n-Dekan-Membran mit Endotoxin aus Escherichia Coli

Die physiologische Existenz von Bakterien auf der menschlichen Haut sowie die bei großflächigen Verbrennungen auftretende

Gewebeanoxie, der direkte Kontakt zum Blut- und Lymphsystem ließen in den vergangenen Jahrzehnten vielfach die Frage berechtigt erscheinen, ob es sich bei der Verbrennungskrankheit nicht um eine bakterielle Toxinwirkung handeln könnte.
Bei Bakterien kennen wir zwei Gruppen von Toxinen:

Die thermolabilen Exotoxine wie z.B. Enterotoxine von stapylococcus aureus, das Diphterietoxin von corynebacterium diphteriae, das Tetanustoxin und das hochgiftige Botulinustoxin.
Diesen thermolabilen Toxinen stehen die thermostabilen Endotoxine wie das Choleratoxin und zuletzt die von Darmbakterien gebildeten Colicine gegenüber. Die Wirkung dieser Colicine im biologischen System ist bekannt. Ihre Toxizität beruht entweder auf der Hemmung des DNS- und RNS-Abbaus (Colicin $E_2$) oder auf der Inaktivierung der 30 S-Ribosomenuntereinheit, wodurch es zur Hemmung der Eiweißbiosynthese kommt (Colicin $E_3$).
Das Endotoxin (ein Lipid-Polysaccharid-Protein-Komplex) kann auch einen Endotoxin-Schock auslösen.

BERNHEIMER (4) beschreibt zytolytisch wirksame Bakterientoxine, die dadurch wirksam werden, daß sie die normale Funktion und bzw. oder die Struktur von Zellmembranen verändern. Es gibt SH-aktivierte zytolytische Toxine und Toxine, von denen eine SH-Aktivierung nicht bekannt ist.
BERNHEIMER beschreibt desweiteren Wechselwirkungen bakterieller Toxine mit Lipid-Monolayern, Bilayern und Dispersionen. Staphylococcen $\alpha$-Toxin hat eine relativ hohe Oberflächenaktivität, was mit der hydrophoben Wechselwirkung mit Lipiden zusammenhängt. $\delta$-Toxin ist ebenfalls äußerst oberflächenaktiv. Ringpolymere mit einer 12 S-Sedimentationskonstanten werden nach Zugabe von 3 S $\alpha$-Toxin zu künstlichen Membranen, die aus Phosphatidylcholin, Cholesterin und Diacetylphosphat

bestehen, gebildet. Der gleiche Effekt läßt sich durch Zugabe von $\alpha$-Toxin (Staphyllokokken) zu künstlichen Membranen aus Diglyceriden, Lysolecithinen und Cholesterin erreichen. Das legt die Folgerung nahe, daß bestimmte Lipide eine Polymerisation des Toxins bewirken.

SCHINDLER und ROSENBUSCH (46) fanden, daß ein Matrix-Protein aus der Außenmembran von escherichia coli Kanäle in Lipid-Bilayer formt. Die Anzahl dieser Kanäle ist proportional dem Proteinanteil der Membran und bleibt über mehrere Stunden konstant. Die Kanäle haben jeweils die gleiche Größe mit einem Durchmesser von ca. 1 nm und einer Leitfähigkeit je Kanal von 0,14 nS in 0,1 m-NaCl-Lösung. Zusätzlich zur Ionenleitfähigkeit gewähren die Kanäle kleinen ungeladenen Molekülen eine freie Diffusion. Es gibt offene und geschlossene Kanäle. Das Matrix-Protein bindet Detergentien nur in seiner nativen, in wässrigenPhasen unlöslichen Form. Lösungsmittel wie Benzol oder Toluol lösen es, ohne jedoch Disaggregationen oder Denaturierung zu verursachen. Das Matrix-Protein wird von escherichia coli BE durch enzymatische Sequenzhydrolyse, Hitzeextraktion und Gelfiltration auf Sepharose-48 in Gegenwart von 0,1 %iger Dodecylsulfat-Lösung gewonnen und an einem Bilayer mit einer spezifischen Kapazität von 0,7 $uF/cm^2$ und einem spezifischen Widerstand von $10^8 \Omega cm^2$ getestet. 15 Minuten nach Membranbildung wird eine Spannung von 240 mV appliziert, die innerhalb von zwei Minuten zu einem Stromanstieg durch die Membran von 0 auf 1,6 nA führt. Nach 5 Minuten ist ein Steady-State-Strom von 0,8 - 1,0 nA erreicht. Während der ersten zwei Minuten ergibt sich ein zuerst steil ansteigender und dann unmittelbar steil abfallender Stromverlauf, während sich der Steady-State-Strom um $0,9 \pm 0,1$ nA bewegt. Die Abhängigkeit der Leit-

fähigkeit von der Proteinkonzentration bestimmt den Steady-State-Level und zwar in linearer Abhängigkeit von der Protein-Lipid-Konzentration. Die Schwankungen der Leitfähigkeit im Steady-State-Bereich erklären sich wahrscheinlich durch Öffnen und Schließen der Kanäle.

In dieser Hinsicht wird die Wechselwirkung von escherichia coli Endotoxin 055:B5 (DITCO Laboratories Detroit, Michigan, USA, Contr. 643 030) auf die ox. Cholesterin/n-Dekan-Membran untersucht. Die Elektrolytkonzentration beträgt 1 m-NaCl, pH 7,4 (Tris), 25°C. Es werden Konzentrationen von 0,1 - 10 ug/ml escherichia-coli-Toxin getestet. Während 30 Minuten werden die möglichen Leitfähigkeitsänderungen gemessen. Eine Leitfähigkeitserhöhung kann bei einer Meßreihe von mehr als 12 Membranen nicht beobachtet werden. Schwankungen um einen Steady-State-Zustand werden zunächst vermutet, erweisen sich jedoch statistisch als nicht signifikant (vgl. Abb. 18).

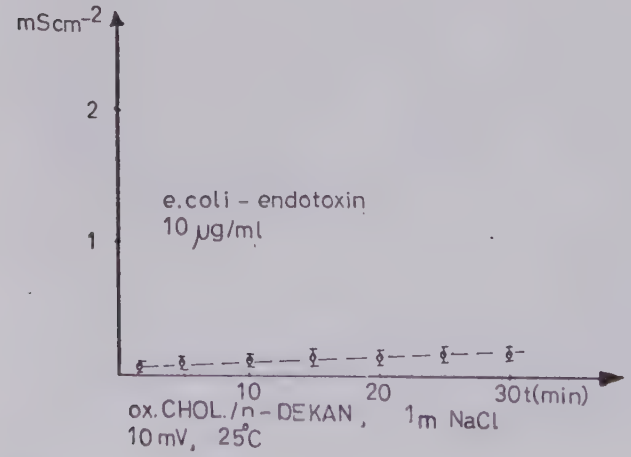


Abb. 18

Im Gegensatz zu den Versuchen von SCHINDLER et al. (46), die an mittels Ultraschall hergestellten Phospholipidvesikeln eine Wirkung von escherichia-coli-Toxin festgestellt hatten, zeigt sich an der ox. Cholesterin/n-Dekan-Membran kein Effekt durch dieses Endotoxin.
MONTAL und MUELLER (zit. nach SCHINDLER (46)) beschreiben Kontrollexperimente, in denen proteinhaltige Vesikel im selben Versuchsaufbau wie bei Messungen dieser Arbeit auf nur eine Seite einer reinen Phospho-Lipid-Membran gebracht werden. Bei Zugabe von escherichia-coli-Toxin auf nur eine Seite der Membran werden keine Leitfähigkeitsänderungen erreicht. Die Vesikel werden in den angegebenen Konzentrationen nicht in die vorbestehende Membran eingebaut. Der Wirkmechanismus des escherichia-coli-Toxins scheint somit an speziell präformierte Membrane gebunden zu sein. Allein die spezifischen Membraneigenschaften scheinen ein besonderes Leitfähigkeitsverhalten zu bewirken. Auch durch Änderungen der Elektrolytbedingungen (NaCl-, KCl-, $MgCl_2$-. $CaCl_2$-Ionen verschiedener Konzentrationen (0,01 - 1 molar) zeigen keine Anderungen im Leitfähigkeitsverhalten der Membran (46).

Daraus Rückschlüsse auf einen Wirkungsmechanismus im biologischen System zu schließen, scheint jedoch verfrüht.
Im Zusammenhang mit der Verbrennungskrankheit wird von bakteriologischer Seite wohl keine Lösung speziell der Fragestellung des Spättodes zu erwarten sein. Durch steriles Arbeiten konnte SCHOENENBERGER (51) bei der Isolation eines Verbrennungsgiftes aus Mäusehaut eine Beteiligung durch bakterielle Stoffwechselgifte ausschließen.

## 2.8. Wechselwirkung der ox. Cholesterin/n-Dekan-Membran mit delipidiertem Nativ-Protein aus Mäusehaut

Hier gelangen die nach der Methode von SCHOENENBERGER (siehe S. 14) isolierten Hautbestandteile zur Untersuchung ihrer Wechselwirkung am Lipid-Bilayer. Es ergibt sich in jedem Falle eine signifikante Leitfähigkeitserhöhung bei dem Nativ-Protein (nativer Precursor) einerseits, sowie bei der Proteinkomponente aus verbrannter Haut andererseits.

Im folgenden werden zwei Aufarbeitungsgruppen A und N untersucht. Bei beiden Aufarbeitungsgängen wird der auf S. 14 beschriebene Trennungsgang benutzt. Die Aufarbeitung A stammt von einem Mäusekollektiv A, die Aufarbeitung N aus einem anderen Mäusekollektiv N. Es werden jeweils 40 jugendliche weibliche Mäuse (vgl. S. 9) verwendet. Innerhalb der einzelnen Aufarbeitungsgänge werden die Fraktionen I und II getrennt untersucht. Innerhalb dieser Fraktionen wird noch eine Differenzierung nach der eingesetzten Konzentration vorgenommen.
Für die Fraktionen ergaben sich folgende Ergebnisse:

### 2.8.1. Delip. Nativ-Protein-Fraktion N (I)

Für die Fraktion (I) ergibt sich folgendes Bild: Bei einer Konzentration von 1,0 ug/ml wird eine Leitfähigkeit von 0,90 $mS/cm^2$ nach 30 Minuten erreicht.

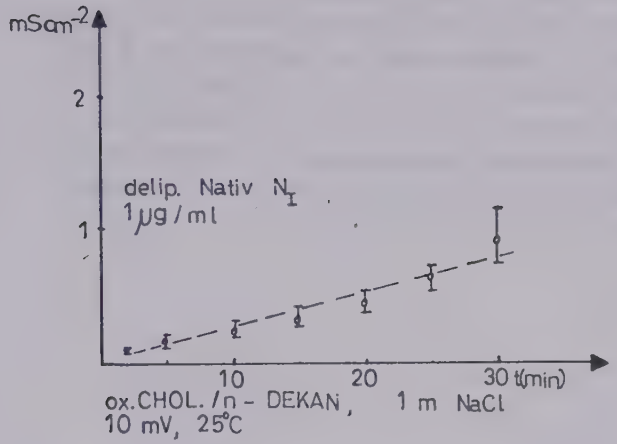


Abb. 19

2.8.2. Delip. Nativ-Protein-Fraktion N(II)

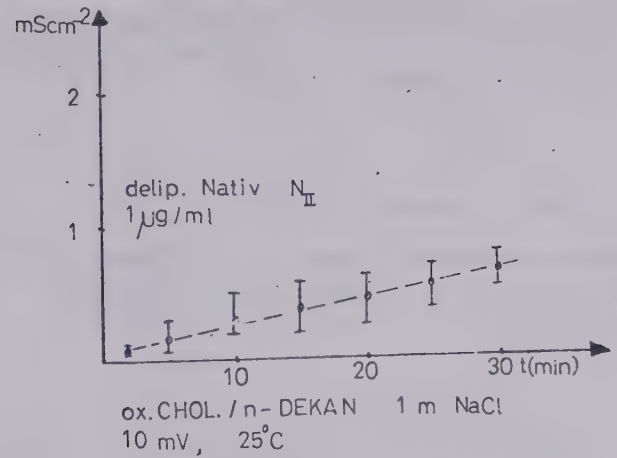


Abb. 20

Für die aus unverbrannter Haut isolierte Fraktion N (II) ergibt sich im selben Aufarbeitungsgang ebenfalls eine konzentrationsabhängige Leitfähigkeitsänderung. Es erfolgt ein linearer Leitfähigkeitsanstieg. Nach 30 Minuten ergibt sich für die Fraktion N (II) in der Konzentration von 0,1 ug/ml ein Leitfähigkeitsanstieg auf 0,3 $mS/cm^2$. Bei der 10-fachen Nativ-Protein-Konzentration von 1 ug/ml ergibt sich ebenfalls nach 30 Minuten ein Anstieg auf 0,67 $mS/cm^2$.

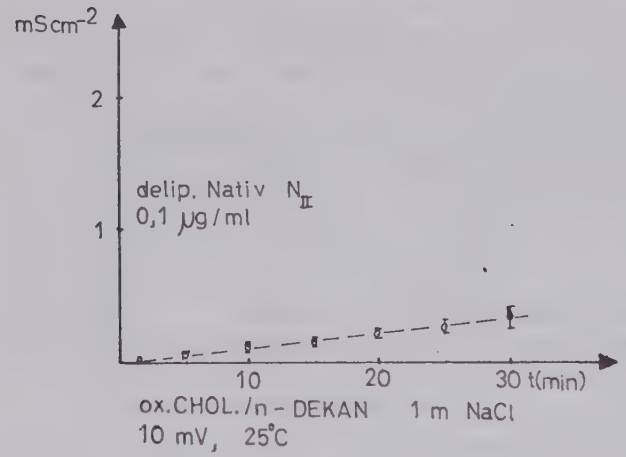


Abb. 21

2.8.3. Delip. Nativ-Protein-Fraktion A (I)

Das in dem Aufarbeitungsgang A isolierte Nativ-Protein der Fraktionen I und II wird den gleichen Versuchsbedingungen unterworfen.

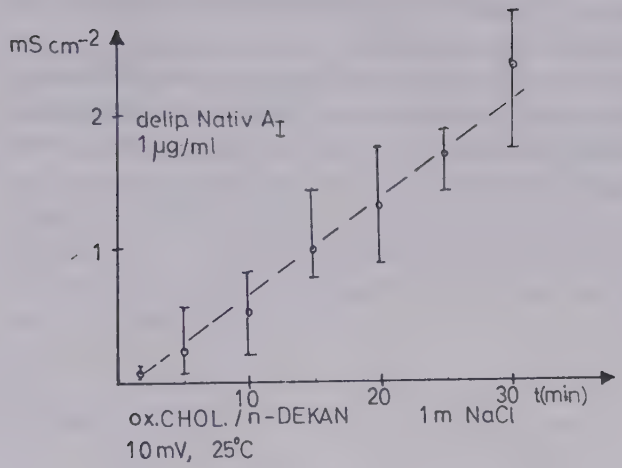


Abb. 22

Beim Aufarbeitungsgang A ergibt sich für die Nativ-Protein-Fraktion A (I) bei einer Konzentration von 1,0 ug/ml ein Leitfähigkeitsanstieg auf 2,4 mS/cm$^2$.

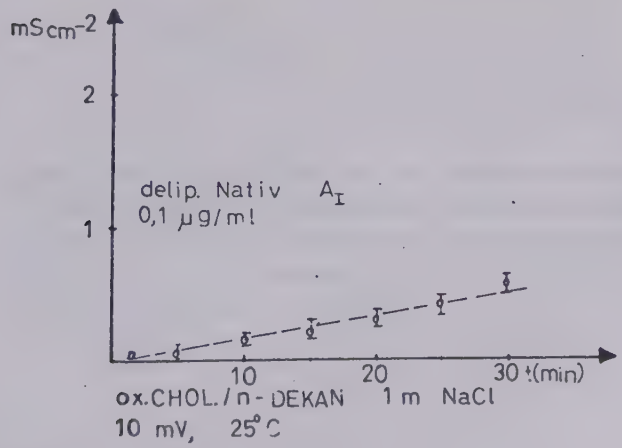


Abb. 23

Bei der entsprechenden Messung mit der 10-fach geringeren Konzentration von 0,1 ug/ml ergibt sich ein Leitfähigkeitsanstieg nach 30 Minuten auf 0,55 $mS/cm^2$.
Auch hier zeigt sich ein konzentrationsabhängiges Ansteigen der Leitfähigkeit. Bei einer 10 mal höheren Nativ-Toxin-Konzentration der gleichen Fraktion wird somit eine 4-5 mal höhere Leitfähigkeit gemessen.

2.8.4. Delip. Nativ-Protein-Fraktion A (II)

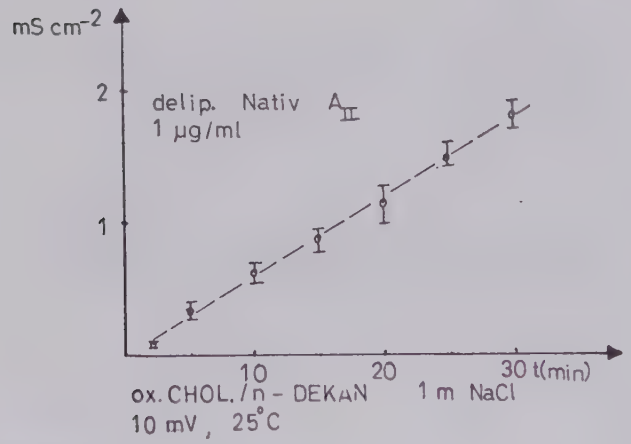


Abb. 24

Der Leitfähigkeitsanstieg bei der Fraktion A (II) ergibt bei einer Endkonzentration an der Membran von 1,0 ug/ml einen Meßwert nach 30 Minuten von 1,8 $mS/cm^2$.

## 2.9. Wechselwirkung der ox. Cholesterin/n-Dekan-Membran mit Toxin aus verbrannter Haut

Ist der Hauptaugenmerk der obigen Experimente auf die Wirkung eines nativen Precursors (natives Toxin) gerichtet, soll in der nun folgenden Messung die Membranwirksamkeit eines nach standardisierter Verbrennung (250°C, 30 sec.) isolierten Toxins mit der Wirkung des Nativ-Proteins verglichen werden. Da sich innerhalb der Fraktionen I und II des Nativ-Haut-Aufarbeitungsganges nur geringfügige Schwankungen der Leitfähigkeitsänderung ergaben, wurde im folgenden nur die Hauptfraktion II des Toxins aus verbrannter Haut untersucht.

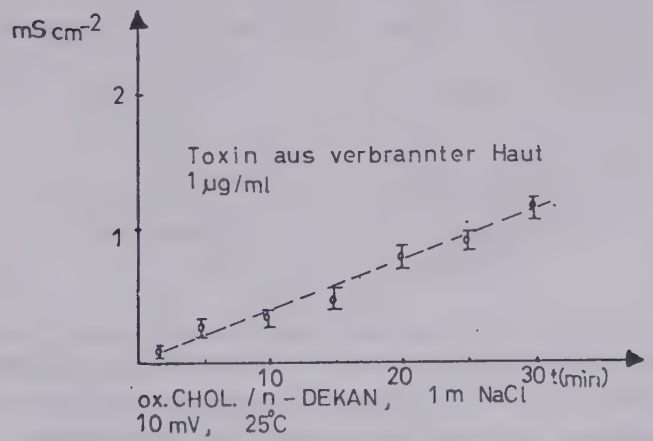


Abb. 25

Mit Toxin aus verbrannter Haut ergibt sich zum Zeitpunkt t = 30 Minuten für eine Konzentration von 1,0 ug/ml eine Erhöhung der Leitfähigkeit auf 1,2 mS/cm$^2$.

Während sich bei einer gleichen Endkonzentration an der Membran von 1,0 ug/ml bei der Fraktion A (II) eine Leitfähigkeit von 1,8 mS/cm$^2$, bei der Fraktion A (I) von 2,4 mS/cm$^2$ ergibt, kann unter gleichen Bedingungen beim Toxin aus verbrannter Haut nur eine Leitfähigkeit von 1,2 mS/cm$^2$ erreicht werden.

| TESTSUBSTANZ | ENDKONZENTRATION an der MEMBRAN in µg/ml | LEITFÄHIGKEIT 30 min n. Zugabe d. TESTSUBSTANZ in mS cm-2 |
|---|---|---|
| Nativ $N_I$ | 1,0 | 0,90 |
| Nativ $N_{II}$ | 1,0 | 0,67 |
| Nativ $N_{II}$ | 0,1 | 0,30 |
| Nativ $A_I$ | 1,0 | 2,40 |
| Nativ $A_I$ | 0,1 | 0,56 |
| Nativ $A_{II}$ | 1,0 | 1,80 |
| Toxin T | 1,0 | 1,20 |

Tab. 7

Je nach Aufarbeitungsgang zeigt sich bei endsprechender Endkonzentration ein unterschiedlicher Leitfähigkeitsanstieg der künstlichen Membran. Die stärkste Wechselwirkung mit dem Lipid-Bilayer zeigt sich bei Fraktionen des Aufarbeitungsganges A (A (I) und A (II), vgl. Tab. 7). Die Leitfähigkeitserhöhung der Membran ist in diesem Falle höher als die Leitfähigkeit nach Wechselwirkung mit Toxin aus verbrannter Haut. Letztere jedoch liegt wiederum mit der Höhe der Leitfähigkeit in der Mitte zwischen den Aufarbeitungsgängen N und A.

## 2.10. Wechselwirkung der ox. Cholesterin/n-Dekan-Membran mit Homogenisat verbrannter Mäusehaut

Bisher wurden die Endprodukte des oben beschriebenen Aufarbeitungsganges (siehe S. 14) untersucht.
Eine Antwort auf eine mögliche Wechselwirkung von Substanzen mit der Membran, die während der Aufarbeitung der Haut entstehen und zum Teil verworfen werden, versuchen die folgenden Messungen zu ergeben.

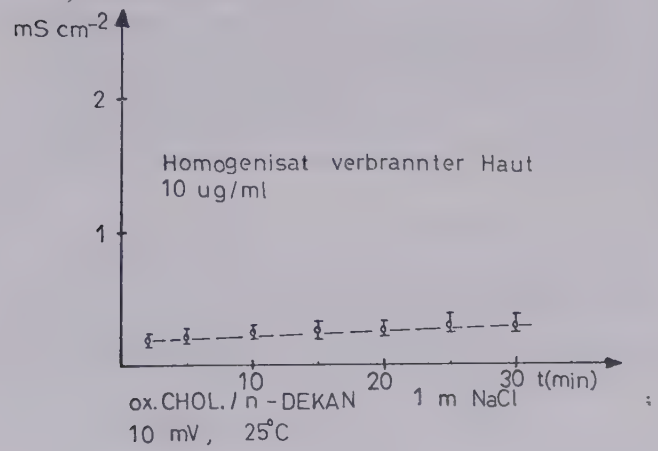


Abb. 26

Das nach standardisierter Verbrennung (250°C, 30 sec.) gewonnene Homogenisat wird den gleichen bisher beschriebenen Meßbedingungen unterworfen. Selbst in einer Endkonzentration von 10 ug/ml an der Membran zeigt sich kein Anstieg der Leitfähigkeit der Membran.
Eine Vergleichsmessung mit Homogenisat nativer Haut ergibt in

den entsprechenden Konzentrationen ebenfalls keinen Leitfähigkeitsanstieg (ohne Abb.).

2.11. Wechselwirkung der ox. Cholesterin/n-Dekan-Membran mit flüchtigen Substanzen aus verbrannter Haut

Bei der Verbrennung von Haut entstehen flüchtige thermische Abbauprodukte des Lipidanteils, nämlich Alkanale wie Hexanal, Heptanal und Oktanal, weiterhin Furanderivate und Benzolderivate. Ein Kondensat dieses Stoffgemisches wird in einem Aliquot ebenfalls an der Membran getestet. Eine Leitfähigkeitserhöhung ergibt sich nicht. Eine Aussage, ob nun eine bestimmte Wechselwirkung einer der oben genannten Stoffe mit der Membran vorliegt, ist kristisch zu beurteilen, da die jeweiligen Konzentrationen in diesem Stoffgemisch nicht vorliegen.

2.12. Wechselwirkung der ox. Cholesterin/n-Dekan-Membran mit Dialysat aus verbrannter Haut

20 ul Dialysat/ml Elektrolyt werden getestet. Ein Anstieg der Leitfähigkeit ergibt sich nicht.

2.13. Wechselwirkung der ox. Cholesterin/n-Dekan-Membran mit Dialysat aus unverbrannter Haut

Auch hier werden 20 ul Dialysat/ml Elektrolyt getestet. Wie bei 2.12. ergibt sich hier ebenfalls keine Leitfähigkeitserhöhung.

2.14. Wechselwirkung der ox. Cholesterin/n-Dekan-Membran mit Lyophilisat aus verbrannter und unverbrannter Haut

Das Lyophilisat wird gegen Wasser und gegen aqua bidest zweimal dialysiert, wobei sich wiederum keine Leitfähigkeitsände-

rung der Membran ergibt.

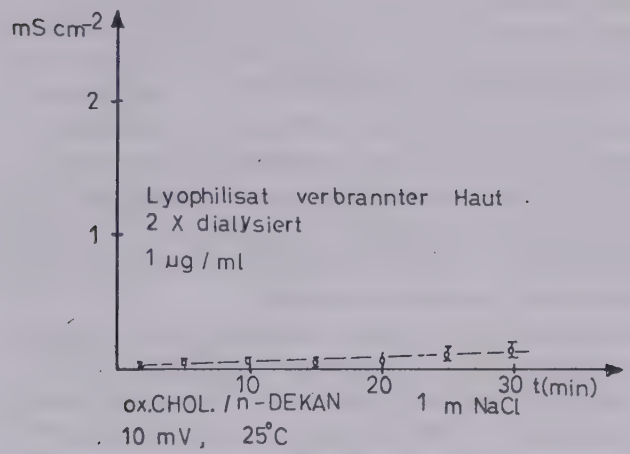


Abb. 27

2.15. Wechselwirkung der ox. Cholesterin/n-Dekan-Membran mit denaturiertem Humanalbumin

Es werden Konzentrationen von 0,1, 1,0 und 10 ug denaturiertem Humanalbumin eingesetzt. Das Humanalbumin (von SERVA) wird zuvor im Wasserbad bei 50°C für 20 Minuten vorbehandelt. Eine Leitfähigkeitserhöhung wird nicht beobachtet.

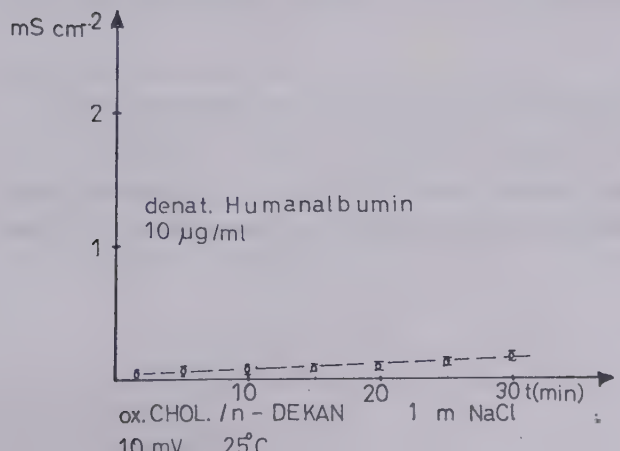


Abb. 28

## 2.16. Wechselwirkung der ox. Cholesterin/n-Dekan-Membran mit Komplement

### 2.16.1. Definition des Komplement-Systems

Komplement (C) wird als Funktion definiert. C vermag antikörperbesetzte Zellmembrane zu perforieren (44). Erythrozyten sind unter den verschiedenen antikörperbesetzten Zellen die technisch am leichtesten zugänglichen. Die Lyse von antikörperbesetzten Hammelerythrozyten ist daher zum allgemein akzeptierten Bezugssystem geworden.
C wird demnach als eine Aktivität definiert, die antikörperbesetzte Erythrozyten unter Standardbedingungen zu lysieren vermag. Sie beruht auf der sequentiellen Reaktion von neun Einzelkomponenten (C 1 - C 9). Die Komponenten sind definierte Serumproteine. Unter biochemischen Gesichtspunkten erscheint der Lysevorgang überwiegend als eine Sequenz von Enzymrekationen.

Durch die WHO wurde eine Nomenklatur des Komplementsystems geschaffen. Demnach lautet die vollständige Reaktionskette C 1 - C 2 - C 3 - C 4 - C 5 - C 6 - C 7 - C 8 - C 9.
Eine Besonderheit stellt die erste Komponente dar. Sie besteht aus einem Komplex mit den Untereinheiten C 1q, C 1r und C 1s (die ihrerseits wieder als charakteristische Proteine isoliert werden können). Daher kommt es, daß das Komplementsystem zwar aus 11 Proteinen, aber aus 9 Komponenten besteht.

### 2.16.2. Histologische Herkunft der Komplement-Komponenten

#### 2.16.2.1. Komplement C 1

Die zur C 1-Synthese befähigten Zellen sind Zylinderrepithelzellen aus dem Dünndarm des Meerschweinchens (COLTON, GORDON,

BORSOS und RAPP 1968, zit. nach (44)). Von derselben Autorengruppe wird für humanes C 1 Colon und Ileum als Syntheseort genannt.

2.16.2.2. Komplement C 2

RUBIN, BORSOS, RAPP und COLTON (1971, zit. nach (44)) machen Milzgewebe von Meerschweinchen für die Synthese von C 2 verantwortlich.

2.16.2.3. Komplement C 3

Die Synthese von C 3 wird von HOCHWALD, THORBECKE und ASOFSKY (1961, zit. nach (44)) für die Mäusemilz, menschliche Lymphknoten, Knochenmark und Ileum nachgewiesen.

2.16.2.4. Komplement C 4

Nach LITTLETON, KESSLER und BURKHOLDER (1970, zit. nach (44)) wird hämolytisch aktiviertes C 4 bei Meerschweinchen durch mononukleäre Zellen gebildet.

2.16.2.5. Komplement C 5

PHILIPS, ROTHER, ROTHER und THORBECKE (1969, zit. nach (44)) gelang der Nachweis der Synthese von C 5 in der Mäusemilz und im Knochenmark.

2.16.2.6. Komplement C 6

Nach ROTHER, THORBECKE, STECHER-LEVIN, HURLIMANN und ROTHER (1968) und ROTHER, PHILIPS, GOETZE und THORBECKE (1968) sind Gewebekulturen aus normaler Kaninchenleber in der Lage, aktives C 6 zu bilden, ebenso die Zellkulturen eines Hepatoms (H 4 JJEG 3) (zit. nach (44)).

2.16.2.7. Komplement C 7

Der Nachweis des Bildungsortes von Komplementfaktor C 7 gelang trotz intensiver Suche bisher noch nicht.

2.16.2.8. Komplement C 8

Nach GEIGER, DAY und GOOD (1972, zit. nach (44)) wurde bei Schweinen die Synthese von C 8 in Niere, Milz, Leber, Lungen sowie wahrscheinlich auch im Intestinum nachgewiesen.

2.16.2.9. Komplement C 9

ROMMEL, GOLDLUST, BANCROFT, MAYER und TASHJIMAN (1970, zit. nach (44)) wiesen die Synthese von C 9 an einem Rattenhepatom MH1C1 nach.
Es gibt somit keinen ausschließlichen Syntheseort im Sinne eines anatomischen Organs für die Komplementfaktoren.

2.16.3. Membranschädigung durch die achte (C 8) und neunte (C 9) Komponente

Der Mechanismus der Membranschädigung durch Komplement ist zum großen Teil unbekannt. Es ist noch unklar, ob C 8 oder C 9 die eigentliche lytische Wirkung entfaltet. Nach der Reaktion von EA C 1-7 mit C 8 fällt auf, daß auch ohne C 9 ein Großteil von Zellen langsam zur Lyse kommt. Wird EA C 1-7 außer mit C 8 auch mit C 9 inkubiert, so erfolgt eine schnelle Hämolyse aller Zellen (STOLFI 1964, zit. nach (44)).
Die durch C 8 vermittelte Hämolyse erweist sich auch als mediumabhängig (SCHULTZ 1971, zit. nach (44)).
Bis heute liegt die Vermutung nahe, daß C 8 der Vermittler einer langsamen und unvollständigen Hämolyse ist. C 9 lysiert die Zellen komplett und rasch. Man kann sich vorstellen, daß C 8 allein zu geringen Schäden führt, daß es aber der zusätzlichen Wirkung von C 9 bedarf, um die C 8-Reaktivität zur

vollen hämolytischen Wirksamkeit zu führen.

Mechanismus der Membranschädigung:

Mit dem EA C 1-7-Komplex geht C 8 eine Bindung ein. Die C 9-Reaktion geht mit spezifischer Bindung an den EA C 1-8-Komplex einher. KOLB, HAXBY, ARROYAVE und MÜLLER-EBERHARD (1972, zit. nach (44)) zeigten, daß ein trimolekularer C 567-Komplex die Bindungsstelle für ein Molekül C 8 bereitstellt und daß durch die Bindung von C 8 Anlagerungsräume für C 9 entstehen. Ein C 5678-Aggregat kann bis zu sechs Moleküle C 9 binden, wird aber schon mit drei Molekülen C 9 lytisch wirksam. Es wird angenommen, daß sich die Komponenten C 6 - C 9 ohne vorherige Spaltung zusammenlagern und daß nicht eine einzelne Komponente, sondern das C 56789-Aggregat insgesamt (MG: $10^6$) die Membranzerstörung bewirkt. Im Stadium EA C 1-9 sind die Zellen noch nicht lysiert, sie sind jedoch irreversibel geschädigt und werden als $E^*$ bezeichnet (MAYER und LEVINE 1954, zit. nach (44)).

Während sich die lytische Funktion des C 9 vor dessen Reaktion durch ein Antiserum blockieren läßt, gelingt dies nicht mehr, wenn C 9 mit der EA C 1-8-Zelle reagiert hat (ROMMEL und MAYER 1971, zit. nach (44)). Nach der Entstehung von EA C 1-9 ist ein Stadium erreicht, das C-unabhängig ist. Von nun an laufen innerhalb der Membran Prozesse ab, deren Natur weitgehend unbekannt ist.

An Erythrozyten (E) stellt man sich einen Dreischrittmechanismus vor:

Der erste temperaturunabhängige Schritt läuft auch in Gegenwart von 0,09 m-EDTA ab. Eine für Vitamin A beschriebene Hemmwirkung (MAJOR, WESTPHAL und WIRTZ 1969, ORYNICH und WIRTZ 1971, zit. nach (44)) soll in dieser Phase wirksam werden.

Eine zweite Phase führt zum aktivierten E. Sie ist zwar

temperaturunabhängig, jedoch durch EDTA hemmbar (FRANK, RAPP und BORSOS 1964, zit. nach (44)).
Eine dritte ebenfalls temperaturunabhängige Phase führt zum "lädierten $E^{4}$". Dieser ist durch Mikroperforationen der Membran gekennzeichnet, die am Austritt niedermolekularer Bestandteile des Zellinhaltes erkennbar werden (GREEN, BARROW und GOLDBERG 1959, zit. nach (44)). Die Umwandlung des "aktivierten $E^{*}$" zum "lädierten $E^{*}$" läßt sich mit Uranyl-Zonen hemmen (MIAYAMA, KOGAMI, YAMADA, YAMADA und KASHIBA 1968, zit. nach (44)). Aber auch der "lädierte" Erythrozyt ist noch nicht mit einem lysierten gleichzusetzen.
Infolge der geringfügig höheren osmotischen Konzentration des Zellinneren wird durch die Mikroperforationen Wasser in die Zelle hineingezogen, wodurch diese mit der Folge einer immer größeren Ausweitung der Perforation anschwillt. Schließlich können auch großmolekulare Substanzen wie Hämoglobin die Zelle verlassen, was den sichtbaren Vorgang der "Lyse" ausmacht.

Bei allen Befunden ist bisher die betroffene Membran außer Acht gelassen worden. Gerade hier muß aber der Schlüssel für das Verständnis des letztlich entscheidenden lytischen Vorgangs gesucht werden. Da natürliche Membrane sehr komplex aufgebaut sind, wird der Vorgang der Membranläsion heute vorwiegend an vereinfachten Modellen studiert. KINSKY, HAXBY, ZOPF, ALVING und KINSKY (1969, zit. nach (23) ) bauten solche Modelle in Form künstlicher Membrane aus Glyzerin- oder Sphingosin-Phospholipiden und Forssman-Hapten auf. Solche künstlichen Membrane ließen sich durch C lysieren, wobei die C-Reaktion ähnlich auf die Membrane einzuwirken schien, wie dies von der Immunhämolyse bekannt ist (HAXBY, GÖTZE, MÜLLER-EBERHARD und KINSKY 2969, HESKETH, DOURMASHKIN, PAYNE, HUMPHREY und LACHMANN 1971, zit. nach (20)).

Bei Studien zur Lyse von Lipid-Membranen durch C fanden HESKETH, PAYNE und HUMPHREY (1972, (19)), daß die Lyse weder auf Cholesterin noch auf ungesättigte Fettsäuren in Phospholipiden angewiesen war.

Nach Behandlung von Erythrozyten mit Komplement entstehen auf der Zelloberfläche elektronenoptisch nachweisbare charakteristische Veränderungen. Es entstehen "Löcher" mit einem Durchmesser von 80-100 Å.
Die Läsionen sollen durch Mizellenbildung in der Lipid-Schicht der Zelloberfläche entstehen ( HUMPHREY und DOURMASHKIN 1969, zit. nach (44)). Sie sind C 8- und C 9-abhängig und werden daher als morphologische Äquivalente der Membranzerstörung gewertet. Es soll eine direkte Korrelation zwischen der Zahl der elektronenmikroskopisch beobachteten Läsionen und der Zahl der mittels funktioneller Analyse berechneten "Treffer" geben (BORSOS, DOURMASHKIN und HUMPHREY 1966, zit. nach (44)). Dieser Effekt hat sich jedoch nur für Meerschweinchen und nicht für humanes Komplement bestätigen lassen. Nach FRANK, DOURMASHKIN und HUMPHREY (1970, zit. nach (44)) soll die Spezies-Herkunft des C auch die Größe der Läsionen beeinflussen.
WOBSCHALL und McKEON (1975,(62)) machten einen Angriff bzw. Lyse eines Lipid-Bilayers durch Komplement wahrscheinlich. Sie beobachteten nach Zugabe von Schweineserum, Kaninchenserum und Komplement zur wässrigen Phase ein starkes Ansteigen der elektrischen Leitfähigkeit des Lipid-Bilayers. Bei niedrigen Konzentrationen wurde ein schrittweises Ansteigen der Leitfähigkeit der künstlichen Membran korreliert mit der Bildung von ca. 2,2 nm großen "Löchern" in der Membran. Die Membrane bestanden aus Schingomyelin gelöst in einem Tocopherol-Chloroform-Methanol-Gemisch. Die Autoren beobachteten keinen Leitfähigkeitsanstieg bei vorhe-

rigem Erhitzen (56°C, 30 min.) von Komplement und Antiserum. Weiterhin wurde kein Leitfähigkeitsanstieg beobachtet, nachdem andere Proteine oder Sera außer Schweinesera hinzugefügt wurden.

HAXBY, GÖTZE, MÜLLER-EBERHARD und KINSKY (18) berichteten über eine Glucosefreisetzung glucosebeinhaltender Liposomen nach Wechselwirkung mit Kaninchen-Anti-Schaf-Erythrozyten-Serum und einem Komplementgemisch. Die Glucosefreisetzung ist streng gebunden an die Anwesenheit der Komplementfaktoren 2 und 8. Eine absolute Notwendigkeit für die Glucosefreisetzung von Komplementfaktor 9 konnte nicht bestätigt werden. Die Messungen wurden mit gereinigten menschlichen Komplementfaktoren durchgeführt.

Die komplementabhängige Zerstörung von Liposomen, aufgebaut aus reinen Lipiden (Sphingomyelin, Lecithin, Cholesterin und Diacethylphosphat) und Forssman-Antigen zeigten KINSKY, HAXBY, ZOPF, ALVING und KINSKY (23). Sie fanden weiterhin heraus, daß die Lipide allein, auch in Lipid-Bilayer-Konfiguration als "Substrat" für Komplement dienen und daß Zellmembrane nicht irgendeines spezifischen endogenen Rezeptors für Bestandteile der Komplementreihe bedürfen. Komplement allein ist also fähig, eine Wechselwirkung mit künstlichen Membranen zu bewirken. Nach den Autoren soll die Komplementkaskade schließlich zur Herausstellung von hydrophoben Gruppen der terminalen Komplement-Komponenten, nämlich C 8 und/oder C 9 führen. Diese Komplement-Komponenten führen dann letztlich zur Zerstörung der Membran durch "Reißen" der nichtkovalenten Bindungen zwischen den Membranlipiden.

HADDING, BITTER-SUERMANN und KÖNIG (15) widersprechen der Auffassung von STOLFI (zit. nach (44)), daß die Wechselwirkung von C 8 mit der Membran zum irreversiblen Schaden führt, wo-

bei C 9 nur einen beschleunigenden Effekt auf die Hämolyse haben soll. Ihrer Ansicht nach vermag hochgereinigtes C 8 in einer Konzentration, in der es zusammen mit C 9 zur vollständigen Hämolyse kommt, allein, also ohne C 9, keinen Zusammenbruch der Membran zu bewirken.
Wie wird der Zusammenbruch der Membran nun bewirkt? INOVE und KINSKY (22) treten bei dem komplementabhängigen Zusammenbruch nicht für ein enzymatisches Aufbrechen der kovalenten Bindungen in Phospholipiden ein. Mittels radioaktiver Markierungen wiesen sie nach, daß 98 % der die Membran bildenden Phospholipide nach Zusammenbruch der Membran unverändert vorlagen. Im Kontrollexperiment, in dem Liposome mit Phospholipase C inkubiert wurden, waren 40-50 % des Lipidbestandteils abgebaut. Einen nicht enzymatischen Abbau bestätigten auch HESKETH, PAYNE und HUMPHREY (19).
Weiter wird diskutiert, daß durch Antikörper aktiviertes C 8 direkt einen Membranzusammenbruch bewirkt oder daß auf einem anderen Weg dem Reactive-Lysis-System ein instabiler C 567-Komplex mit C 8 und C 9 reagiert und erst dann die typischen Schäden an der Erythrozytenmembran bewirkt (20). Obgleich der genaue Mechanismus unbekannt ist, kann doch gesagt werden, daß die terminalen Komponenten des Komplements in der Lipidschicht Micellen bilden, die als "Löcher" imponieren. Es kann nahezu ausgeschlossen werden, daß eine Kombination höherer Komplemente als e i n bestimmtes Protein in Liposome inkorporiert wird. LACHMANN (zit. nach (44)) konnte berichten, daß in dem Reaktive-Lysis-System in Liposomen, die ausschließlich aus Lecithin aufgebaut sind, ebenfalls "Löcher" zu sehen sind.

Die "Doughnut"-Hypothese der Zytolyse durch Komplement (MAYER 1972, (31)) beschreibt eine durch C 5b-9 gebildete Ringstruktur, die in den Lipid-Bilayer eingebettet wird, um ein "Loch"

zu bilden. HAMMER, NICHOLSON und MAYER (16) neigen ebenfalls zu dieser Ansicht.

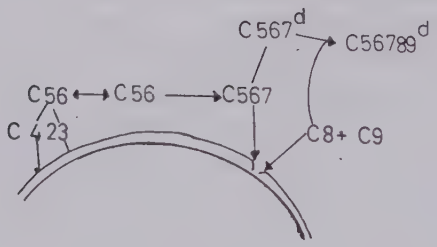


Abb. 29: Schema der Insertion des C 5b, 6, 7-Komplexes in der Membran und Reaktion mit C 8 und C 9 zur Bildung eines Tunnels (nach (44)).

Es wird angenommen, daß C 5b und C 7 hydrophobe Polypeptidketten haben, die herausgestellt werden, wenn C 5b6 mit C 7 reagiert und den Komplex C 5b67 bildet. Diese hydrophoben Ketten haben eine große Affinität zum Lipid-Bilayer. Der Komplex C 5b67 hat eine Halbwertszeit von weniger als 0,1 sec.. Man nimmt weiterhin an, daß dieser Komplex in die inaktive Form C $5b67^{d}$ umgewandelt wird, bevor er die Möglichkeit erhält, sich in den Bilayer einzubauen. Ein kleiner Teil des aktiven Komplexes behält jedoch bei günstiger Stellung der hydrophoben Gruppen zum Lipid-Bilayer die Möglichkeit sich anzulagern. C 8 und C 9 können mit dem membrangebundenen C 5b67 oder mit dem inaktiven Komplex C $5b67^{d}$ reagieren. der letzte Weg führt dann zum noch inaktiven zytolytischen Komplex C $5b6789^{a}$ (44).

Es muß jedoch angenommen werden, daß die beiden hydrophoben

Ketten von C 5b und C 7 wahrscheinlich nicht ganz für die Bildung eines Kanals durch den Bilayer ausreichen. C 8 und C 9 werden wahrscheinlich ebenfalls in den Bilayer integriert. Die Kanäle tragen zu einer größeren Durchlässigkeit der Membran bei. SCHUBERT, BLEVEL, DOMNING und WIEDNER (54) zeigten proteininduzierte Leitfähigkeitsänderungen im Lipid-Bilayer. Sie untersuchten zwei Proteinfraktionen aus menschlichen Erythrozytenmembranen, ein Bande-3-Protein mit einem Molekulargewicht von $10^5$ und ein Glycophprin. Die Grundleitfähigkeit ihrer Membran, also ohne Wechselwirkung mit Proteinfraktion A oder B betrug $\lambda = 1 \cdot 10^{-10}$ bis $5 \cdot 10^{-10} \Omega^{-1} cm^{-2}$. Bei Wechselwirkung mit Fraktion A (Konzentration 1,0 ug/ml) stieg die Leitfähigkeit auf $2 \cdot 10^{-7} \Omega^{-1} cm^{-2}$. Die Wechselwirkung der Proteinfraktion B mit dem Lipid-Bilayer brachte nur eine Leitfähigkeitserhöhung auf $2 \cdot 10^{-9} \Omega^{-1} cm^{-2}$. Es konnte nachgewiesen werden, daß die Fraktion B ein Protein-Aggregat, aufgebaut aus chemisch ähnlichen Untereinheiten wie in Fraktion A, darstellt. Durch induzierte Aggregation bei Fraktion A wurde ein starkes Absinken der Leitfähigkeit erreicht. Somit muß die Fähigkeit der Fraktion A, große Leitfähigkeitsänderungen an der Lipid-Bilayer-Membran zu bewirken an deren niedrigen Aggregationszustand gebunden sein. Die chemische Analyse beider Fraktionen erbrachte eine nahezu identische Zusammensetzung. Der Unterschied liegt also nur im Aggregationszustand.

## 2.17. Leitfähigkeitsänderungen des Lipid-Bilayers durch Komplement

Eigene Messungen:

Die Messungen erfolgen an optisch schwarzen Lipid-Bilayern, gebildet aus ox. Cholesterin/n-Dekan. Die Elektrolytlösung

besteht aus 1-m-NaCl-Lösung. Die Elektrolyttemperatur beträgt beständig 25°C. Der pH-Wert wird mit Tris auf 7,4 eingestellt. An die AgCl-Elektroden wird eine Spannung von 10 mV angelegt. In die hintere Kammer der Teflooneinheit (Volumen = 10 ml) werden 200 ul des Lösungsansatzes von Meerschweinchenkomplement der Firma BEHRING mit einer Endkonzentration von 20 ul/ml an der Membran gebracht.

2.17.1. Meerschweinchenkomplement (25°C)

Bei diesen Messungen wird ein bei 25°C für 30 Minuten inkubiertes Meerschweinchenkomplement-Lösungsgemisch auf seine Wechselwirkung mit der Membran untersucht.

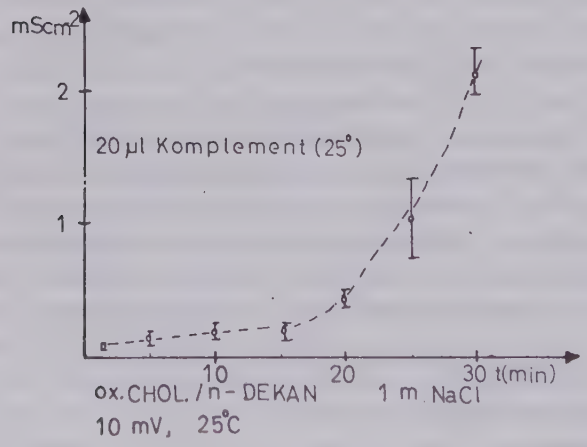


Abb. 30

Bei auf 25°C inkubiertem Meerschweinchenkomplement ergibt sich nach 30 Minuten eine Leitfähigkeitserhöhung auf 2,2 mS/cm$^2$.

2.17.2. Meerschweinchenkomplement (40°C)

Bei diesen Messungen wird ein bei 40°C für 30 Minuten inkubiertes Meerschweinchen-Komplement-Lösungsgemisch auf seine Wechselwirkung mit der künstlichen Membran untersucht.

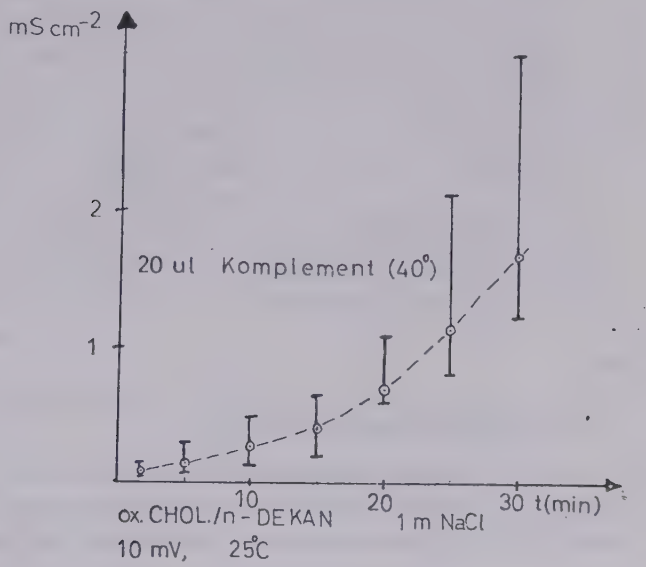


Abb. 31

Bei auf 40°C inkubiertem Meerschweinchenkomplement ergibt sich nach 30 Minuten eine Leitfähigkeitserhöhung auf 1,7 $mS/cm^2$.

2.17.3. Meerschweinchenkomplement (60°C)

Hier nun wird ein bei 60°C für 30 Minuten inkubiertes Meerschweinchenkomplement-Gemisch auf seine Wechselwirkung mit der künstlichen Membran untersucht.
Bei auf 60°C inkubiertem Meerschweinchenkomplement ergibt sich nach 30 Minuten eine Leitfähigkeitserhöhung auf 0,4 $mS/cm^2$.

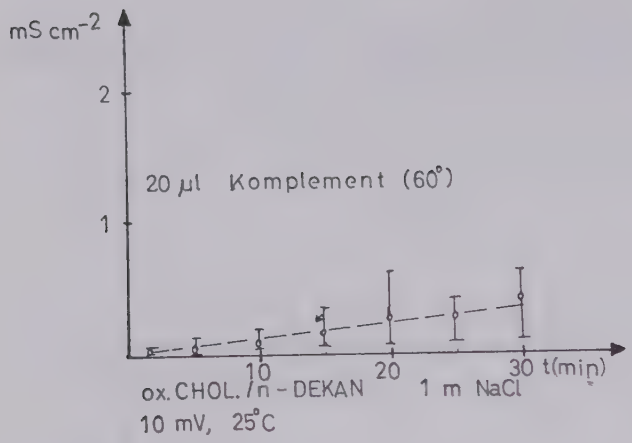


Abb. 32

### 2.17.4. Meerschweinchenkomplement (80°C)

Hier nun wird schließlich ein bei 80°C für 30 Minuten inkubiertes Meerschweinchenkomplement-Lösungsgemisch auf eine mögliche Leitfähigkeitserhöhung an der Membran untersucht.

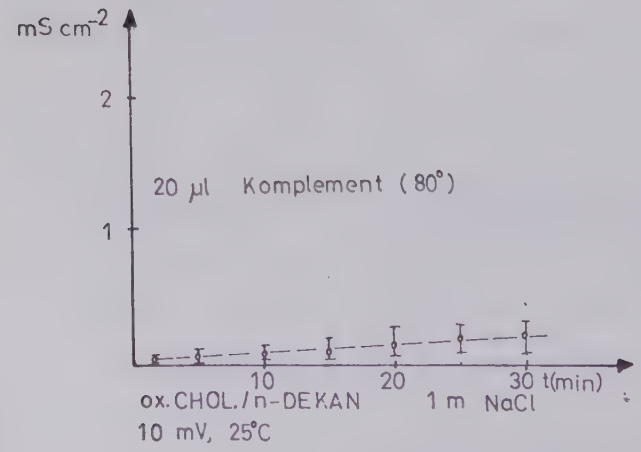


Abb.33

Bei auf 80°C inkubiertem Meerschweinchenkomplement ergibt sich nach 30 Minuten eine Leitfähigkeitserhöhung auf 0,2 $mS/cm^2$.

Während bei 25°C erhitztem Komplement eine Leitfähigkeitssteigerung auf 2,2 $mS/cm^2$ jedoch hauptsächlich zwischen der 20. und 30. Minute eintrat, ergab sich bei auf 40°C erhitztem Komplement nach 30 Minuten eine Leitfähigkeitserhöhung auf 1,7 $mS/cm^2$. Hier erfolgte der Leitfähigkeitsanstieg kontinuierlicher als bei auf 25°C erhitztem Komplement. Jedoch wird nach 30 Minuten eine geringere Leitfähigkeit gemessen. Bei 60°C und bei 80°C erhitztem Komplement ergab sich keine signifikante Leitfähigkeitserhöhung.
Die Messungen sprechen für eine Inaktivierung von Komplement durch starke Hitze (über 60°C), während bei mittleren Temperaturen (25°C, 40°C) eine Aktivierung von Komplement zu vermuten ist.

2.17.5. Meerschweinchenkomplement und E.Coli Endotoxin

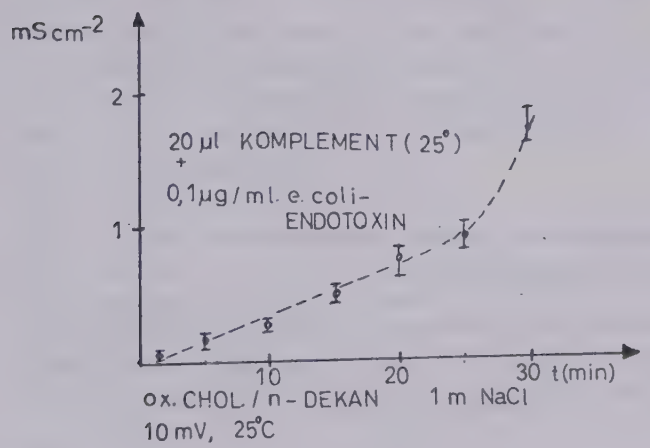


Abb. 34

War escherichia coli-Toxin allein in der künstlichen Membran nicht leitfähigkeitssteigernd, so konnte auch durch Zusatz von Komplement nur der für Komplement allein gemessene Leitfähigkeitsanstieg beobachtet werden.

2.17.6. Meerschweinchenkomplement und delip. Nativhaut

In Kombination mit Komplement wurde bei der Nativ-Fraktion A ein leichtes Absinken der Leitfähigkeit gegenüber der Nativ-Probe allein festgestellt. Hier wurde nach 30 Minuten ein Leitfähigkeitsanstieg auf 1,2 mS/cm$^2$ gemessen.

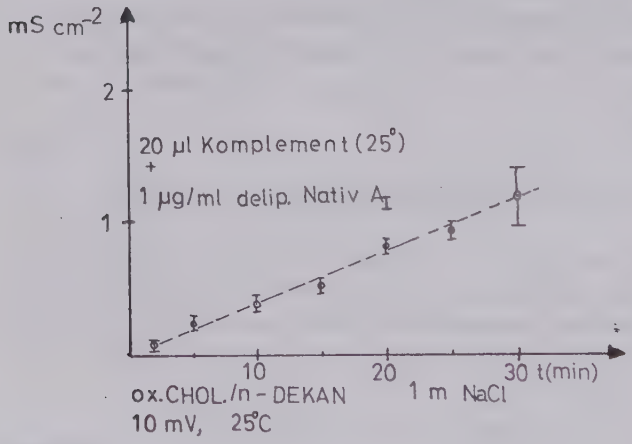


Abb. 35

2.18. Möglichkeiten der Komplementaktivierung

2.18.1. Der klassische Weg

Die Aktivierung der Komplementkomponenten durch komplementbindende Immunglobuline (IgM, IgG) wird als der klassische Weg der Komplementaktivierung bezeichnet. Das Molekül C 1q ist

das Erkennungselement. Dieses bindet sich an Rezeptoren auf dem Fc-Stück von Immunglobulinmolekülen und löst die Aktivierung des Systems aus. Zur Freilegung des Fc-Stücks und damit seiner Rezeptoren bedarf es einer Antigen-Antikörper-Rekation, die eine entsprechende Konformationsänderung nach sich zieht. Nur Immunglobuline mit Rezeptoren für C 1q sind fähig, Komplement zu binden und über den klassischen Weg zu aktivieren. Von IgM genügt ein einziges Molekül an der Zelloberfläche, während von IgG hierfür mindestens zwei benachbarte Moleküle notwendig sind. Als erster Schritt verbinden sich die Untergruppen von C 1 zum Komplex C 1qrs, dem eine Schlüsselstellung zukommt. Er aktiviert C 4 und C 2, die wiederum auf C 3 einwirken. Unter Abspaltung von C 3a entsteht der Komplex C 4b2a3b, der die Komponenten C 5 bis C 9 beeinflußt und den Aufbau der zytolytisch wirksamen Einheit C 5b-C 9 einleitet.

2.18.2. Der "Alternate Pathway" oder sog. Nebenschluß

War man bis vor wenigen Jahren noch überzeugt, daß allein die Aktivierung von C 1 durch Ag-Ak-Komplexe die Komplementreaktion in Gang setzen kann und daß nur über eine C 1-Aktivierung auch die anderen Komponenten aktiviert werden können, so weiß man heute, daß dieser Zugang zur Komplementreaktion nur einer von mehreren und wahrscheinlich nicht einmal der bedeutendste Zugang ist.
Andere Zugänge als die über C 1 werden in der angelsächsischen Literatur als "alternate pathway", "C 1 C 4 C 2 - bypass" oder als "C 3 shunt activation" bezeichnet. Folgende Aktivierungsmöglichkeiten bestehen:
1. die direkte Aktivierung von C 3
a) Aktivierung durch Enzyme
b) Aktivierung durch das C 3 Aktivator-System

c) Aktivierung durch das Properdinsystem

d) Aktivierung durch Polysaccharide, Zymosan, Endotoxin

e) Aktivierung durch Immunglobuline

2. Isolierte Aktivierung von C 3

Weiterhin sprechen Anzeichen für eine antikörperunabhängige Aktivierung von C 1, also einem Aktivierungsmechanismus, der nicht über die Immunglobuline IgM und IgG erfolgt.

Die direkte Aktivierung von C 3:
Als Direkt-Aktivierung von C 3 werden diejenigen Prozesse angesehen, bei denen die biologischen oder hämolytischen Funktionen von C 3 ohne die Vermittlung von C 1, C 4 und C 2 entstehen.

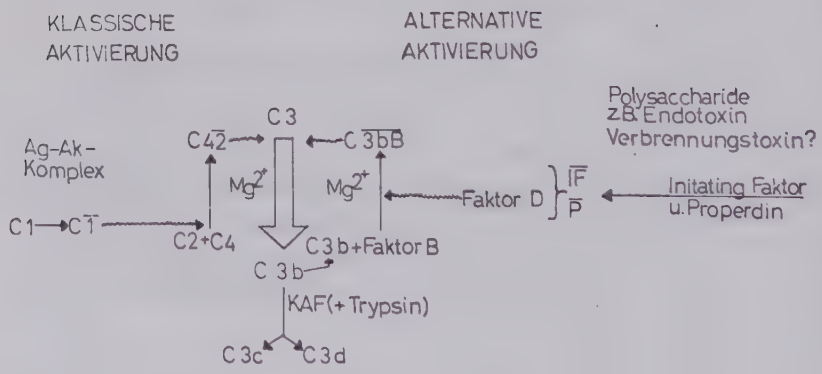


Abb. 36

Die klassische wie auch die alternative Aktivierung bringen eine C 3-Konvertase hervor: C $\overline{42}$ in dem ersten und C $\overline{3bB}$ in dem zweiten Fall. ⇝ bedeutet Aktivierungsvorgang. C $\overline{3bB}$ ist identisch mit C 3A oder GGG. Faktor B ist identisch mit

C 3PA oder GBG. Faktor D ist gleichzusetzen mit 3S $\alpha_2$-Globulin oder der pro-GBGase (verändert nach (37)).

Aktivierung durch Enzyme

Enzyme wirken direkt spaltend auf C 3 ein, so daß Bruchstücke (C 3a) entstehen, die sich funktionell wie die nach C 42-Einwirkung entstandenen Bruchstücke verhalten. Eine Identität dieser basischen Peptide scheint dagegen noch nicht vorzuliegen. Trypsin und Plasmin wirken ebenfalls spaltend auf C 3 ein. Auch bestimmte ubiquitäre Gewebsproteasen scheinen in der Lage zu sein, das C 3-Molekül zu zerlegen (44). Hält man sich vor Augen, daß auch durch banale mechanische Gewebsläsionen solche Proteasen freigesetzt werden, so liegt es nicht fern, bei den durch Verbrennung entstehenden eingreifenden Veränderungen in die Körperhomöostase an eine Aktivierung des Komplementsystems über den "alternate pathway" durch bei der Verbrennung entstandene oder freigesetzte Substanzen zu denken.

Aktivierung durch das C 3-Aktivator-System

Im Serum von Menschen, Kaninchen und Meerschweinchen wurde ein Protein entdeckt, das C 3 aktivieren kann, selbst aber keine C-Komponenten darstellt. Dieses Protein ist in seiner nativen Form inert und wird als C 3-Proaktivator (C 3PA) bezeichnet. Substanzen wie Zymosan, Inulin, Cobratoxin und $\gamma$1-Ig vom Meerschweinchen sind in der Lage, C 3PA direkt und auch durch Vermittlung weiterer Serumfaktoren in seine gegenüber C 3 aktiven Form überzuführen. Der C 3-Aktivator wirkt dann auf C 3 analog zum C 42-Enzym ein, d.h., es entstehen sowohl biologisch wirksames C 3a als auch hämolytisch aktives C 3b, das die Komplementreaktion bis C 9 in Gang zu setzten vermag.

Cobragift besitzt C-inaktivierende Fähigkeiten. Schon 1917 fand NATHAN (zit. nach (44)), daß die Cobragiftwirkung nicht direkt gegenüber C erfolgt, sondern daß zur C-Inaktivierung die Vermittlung eines hitzelabilen Faktors notwendig ist: C 3PA ist ein hitzelabiles $\beta$ 1-Globulin mit einem Molekulargewicht von 80 000 und einer Sedimentationskonstanten von 5 S. Der C-inaktivierende Bestandteil des Cobragifts (VF) besitzt ein Molekulargewicht von 140 000 und eine Sedimentationskonstante von 6,8 S (zit. nach (44)). VF ist selbst inaktiv. In Gegenwart von $Mg^{2+}$-Ionen bildet sich ein Komplex aus VF + 3PA. Dieser Komplex hat ein Molekulargewicht von 210 000 und eine Sedimentationskonstante von 9 S.

Aktivierung durch das Properdinsystem

Beim Properdin handelt es sich um ein Reaktionssystem, das z.B. durch Bakterien aktiviert werden kann und das seinerseits aktivierend auf C 3 einwirkt. Die Komponenten des Properdinsystems haben sich bis heute einer eindeutigen Definition entzogen. Dem Properdin wird die Fähigkeit zugeschrieben, sich in Gegenwart von $Mg^{2+}$-Ionen mit Zymosan zu einem Komplex (PZ) zu verbinden. Dieser Komplex wirkt auf den Co-Faktor A ein. Der neue PZA-Komplex verbindet sich mit dem C 3PA. Dieser wirkt schließlich aktivierend auf C 3 ein.

Aktivierung durch Polysaccharide, Zymosan und Endotoxin

Hochmolekulare Polysaccharide wie Dextran, Inulin, Agar sowie Zymosan und Endotoxin aus gramnegativen Bakterien greifen im Serum C 3 an. Diesen gemeinsam ist ein Reaktionsweg, der aus Cofaktoren besteht, die mit den Substanzen auf C 3PA einwirken können, wobei dieser zum C 3-Aktivator konvertiert wird, der dann seinerseits C 3 aktiviert (GÖTZE und MÜLLER-EBERHARD 1971, zit. nach (44); BITTER-SUERMANN 1972, zit. nach (44)). Diese Substanzen brauchen eine ganze Kette von

Zwischenfaktoren, um den C 3PA umzusetzen. Der Reaktionsweg ist noch nicht aufgeklärt. Wie bei der C 3-Aktivierung durch Cobra-Faktor wird auch nach der Aktivierung des C 3 durch Zymosan die ihm folgende Reaktionskette (C 5 - C 9) angestoßen.
Bei Endotoxin handelt es sich ebenfalls um einen Reaktionsweg über C 3PA. Er wird durch Lipopolysaccharide zum C 3-Aktivator konvertiert und kann nun auf C 3 einwirken und damit auch die folgenden C-Komponenten aktivieren.

Aktivierung durch Immunglobuline
Das F(ab)-Stück mancher Antikörper besitzt die Fähigkeit, unter Vermittlung von Cofaktoren C 3PA zu konvertieren und auf diese Weise C 3 und die folgende Reaktionskette direkt zu aktivieren (SANDBERG, OLIVEIRA und OLSER 1971, zit. nach (44)). Über diesen Reaktionsweg kann z.B. das $\gamma$1-Ig des Meerschweinchens auf C 3 einwirken. Dieses Molekül ist unfähig, die "klassische" Reaktionssequenz über C 1 auszulösen. Hingegen kann $\gamma$2-Ig des Meerschweinchens C 3 wie auch C 1 direkt aktivieren.

Antikörper-unabhängige Komplementaktivierung

Für C 1 kommt es schon bei einfacher Ultrazentrifugation von Meerschweinchenseren in Zucker-Dichtegradienten bei einer Ionenstärke von 0,065 zu einer Aktivierung dieser Komponente (COLTEN, BORSOS und RAPP 1968, zit. nach (44)). Ebenso führt die Isolierung von C 1 über DEAE-Zellulose zur Aktivierung (BORSOS, RAPP und WALZ 1964, zit. nach (44)).

## 3.1. Diskussion

### 3.1.1. Erythrozytenhämolyse durch delipidiertes Nativprotein aus Haut (identisch mit dem nativen Precursor)

Bei großflächigen Verbrennungen werden nach JAMES bis 43 %, nach RAKER und ROVIT nur 8-10 % der Erythrozyten zerstört (zit. nach (27)). Zwischen dem Umfang der Gewebeschädigung und der Stärke der Hämoglobinämie soll eine direkte Beziehung bestehen.

Entstehen nun bei der Verbrennung der Haut giftige Produkte oder werden sie freigesetzt, d.h., sind membranwirksame Substanzen schon in nativer Haut vorhanden oder werden diese erst durch ein thermisches Trauma gebildet?
In den vorliegenden Messungen konnte gezeigt werden, daß schon natives Protein aus den Geweben der Haut in bestimmten Konzentrationen fähig ist, Erythrozyten zur Lyse zu bringen.
In dieser Arbeit wurden drei Nativ-Protein-Fraktionen, die nach der Aufarbeitungsmethode nach SCHOENENBERGER (vgl. S. 14) gewonnen wurden, auf ihre hämolytische Wirkung hin untersucht. Um einen Einfluß auf die Hämolyse durch das bei der Hautaufarbeitung benutzte SDS auszuschließen, wurde mit Hilfe zweier Verdünnungsreihen (vgl. S. 18f.) eine SDS-Konzentration gewählt, bei der allein, ohne Zusatz von delipidiertem Nativ-Protein noch keine Hämolyse erzielt wurde.
An den Erythrozyten als biologischer Membran wurden nur Hämolyseversuche mit delipidiertem Nativ-Protein unternommen. Zweck dieser Messungen war herauszufinden, ob einem nativen Protein ein zytolytischer Effekt zuzuschreiben ist. Weiterhin wurde versucht, einen Unterschied der Hämolysefähigkeit der einzelnen Nativ-Protein-Fraktionen I, II und III herauszufinden.
Auf den Seiten 20 bis 23 finden sich die einzelnen Hämolyse-

kurven der Fraktionen I bis III. Bei allen drei Fraktionen erwies sich eine Konzentration von mehr als 0,5 mg delipidiertem Nativ-Protein pro ml Lösungsmittel (0,9 %ige NaCl-Lösung oder $10^{-3}$ %ige SDS-Lösung) als vollständig hämolytisch wirksam. Um 50 % der Erythrozyten zur Hämolyse zu bringen, wurden in der NaCl-Lösung von Fraktion I 0,22 mg/ml, von Fraktion II 0,34 mg/ml und von Fraktion III 0,27 mg/ml Nativ-Protein benötigt. Die Vergleichsmessungen in $10^{-3}$ %iger SDS-Lösung ergaben ähnliche Werte, nämlich 0,28 mg/ml für Fraktion I, 0,25 mg/ml für Fraktion II und 0,32 mg/ml für Fraktion III.

Bei den Fraktionen I und III wurden in der SDS-Lösung geringfügig höhere Nativ-Protein(Nativ-Toxin)-Konzentrationen benötigt, um die Hälfte der Erythrozyten zur Lyse zu bringen als im NaCl-Lösungsansatz. Bei der Fraktion II hingegen ergab sich ein umgekehrtes Bild. Hier wurde im SDS-Lösungsansatz eine geringere Nativ-Protein-Konzentration benötigt, um 50 % der Erythrozyten zu lysieren. Der Unterschied erweist sich statistisch jedoch als nicht signifikant. Somit konnte innerhalb der drei Fraktionen kein signifikanter Unterschied im hämolytischen Verhalten gefunden werden.

Die hämolytische Wirksamkeit scheint dagegen erwiesen. Eine Erklärung für einen Wrkungsmechanismus kann damit aber noch nicht gegeben werden. Folgende Möglichkeiten der Lyse lassen sich denken:

Das Nativ-Protein "schlägt" Kanäle in die Erythrozytenwand, die dem relativ großen Hämoglobinmolekül Durchtritt gewähren und es zur Hämoglobinfreisetzung kommen lassen. Eine andere Möglichkeit bestünde in einem Aufklapp-Mechanismus: das Nativ-Protein setzt größere Läsionen, die einen Teil der Erythrozy-

tenmembran regelrecht "wegklappbar" machen. Weiterhin wäre eine osmotische Hämolyse nicht auszuschließen. Das Nativ-Protein könnte ähnlich wie Harnstoff (vgl. S. 28f.), nachdem es in die Erythrozyten gelangt ist, einen reaktiven Wassereinstrom auslösen, der über ein Anschwellen der Erythrozyten schließlich zum "Platzen" derselben führt und somit Hämoglobin freisetzt.

Mir scheint jedoch eine Bildung von Kanälen in der Erythrozytenmembran wahrscheinlicher. Bei allen Fraktionen I bis III mit Konzentrationen von 0,5 mg/ml konnte eine 100 %ige Hämoglobinfreisetzung erreicht werden. Durch Bestimmung des Hämatokritwertes konnte gezeigt werden, daß bei einer Konzentration von 0,5 mg/ml Nativ-Toxin 78 % der Erythrozyten erhalten bleiben, d.h. genauer, nur 22 % der Zellen tragen nicht mehr zum Hämatokrit, also dem Volumenanteil der Erythrozyten am Volumen des Testansatzes bei. Die Diskrepanz zwischen 100 %iger Hämoglobinfreisetzung einerseits und einer Zerstörung von nur 22 % der Erythrozyten andererseits, jeweils bei 0,5 mg/ml Nativ-Toxin-Konzentration könnte folgendermaßen erklärt werden: Eine Konzentration von 0,5 mg/ml Nativ-Toxin wirkt auf zweierlei Arten Hämoglobin freisetzend:

1.) "Alte" Erythrozyten (mit möglicherweise eingeschränktem Energiestoffwechsel) gehen zugrunde (vgl. 22 % lädierter Erythrozyten) und können somit keinen, d.h. nur einen sehr geringen (auch die Erythrozytenwände haben noch ein Volumen) Volumanteil zur Hämatokritmessung erbringen. Der Hämoglobinanteil dieser zerstörten Erythrozyten stellt einen Betrag des durch das Nativ-Protein freigesetzten Hämoglobins dar.

2.) Der in den Hämolysekurven (vgl. S. 20 bis 23) beschriebene vollständige Hämoglobinaustritt bei Konzentrationen von mehr als 0,5 mg/ml Nativ-Protein erfolgt über Kanäle, die hämoglobindurchlässig sind. Die morphologische Identität der Erythrozyten mit Kanälen bleibt jedoch weitgehend erhalten.

Somit könnte ein vollständiger Hämoglobinaustritt bei einem im Verhältnis geringeren Absinken des Hämatokrits erklärt werden.

Da die geforderten Kanäle dem Hämoglobinmolekül entsprechend sehr groß dimensioniert sein müßten, ist als Gegenargument anzugeben, daß relativ kleine Moleküle wie $Na^+$ und $K^+$, die mit ihrer Hydrathülle immer noch kleiner sind als das Hämoglobinmolekül, schon vor einem evtl. Hämoglobinaustritt zwischen Innen- und Außenmedium des Erythrozyten in ihrem physiologischen Verteilungsmuster gestört sein müßten.

Die $Na^+$- und $K^+$-Ionen-Konzentrationen im Erythrozyten (vgl. S. 30) brachten jedoch keine Nativ-Protein-konzentrationsabhängigen Schwankungen. Man könnte sich somit vorstellen, daß trotz Kanalbildung mit Durchtrittsmöglichkeit für Hämoglobin die $Na^+$-$K^+$-Pumpen für ein Aufrechterhalten der physiologischen $Na^+$- und $K^+$-Ionenverhältnisse sorgen. Dies wäre ein weiterer Nachweis für eine intakte Morphologie und Physiologie der Erytrhozyten, vor allem der "jüngeren" mit noch gut ausgebildetem Energiestoffwechsel.

RAMM und MAYER (36) beschrieben neben einem Hämoglobinaustritt aus sogenannten "Erythrozyten-Ghosts" das Verhalten von $Na^+$-Ionen. Anstelle des Nativ-Proteins (Precursors) dieser Arbeit wurden die Erythrozyten mit Anti-Forssman-Antikörpern und mit hohen Dosen von Meerschweinchenkomplement in Wechsel-

wirkung gesetzt. Sie beschrieben einen gegenüber Hämoglobin viel rascheren Austausch von $Na^+$-Ionen durch Kanäle in der Zellwand. Weiterhin meinten sie, daß ein Netto-Ionen- und Wassereinstrom gemäß dem Donnan-Effekt, der ein Anschwellen und "Platzen" von Erythrozyten bewirkt, lange vor einer signifikanten Diffusion von Hämoglobin durch Kanäle nach außen stattfindet. Sie folgern, daß in ihrem Falle ein Hämoglobinausstrom aus den Erythrozyten unter Komplementeinwirkung eher durch Risse in der Membran als durch primäre Komplement-Kanäle stattfindet.

### 3.1.2. Permeabilitätserhöhung am Lipid-Bilayer durch Valinomycin, delip. nativem Protein (Precursor) und delip. Verbrennungstoxin

Valinomycin als spezifischer Carrier für $K^+$-Ionen erbrachte im KCl-Elektrolyt nach 30 Minuten eine Leitfähigkeitserhöhung auf 200 $mS/cm^2$. Demgegenüber steht eine Erhöhung der Leitfähigkeit im NaCl-Elektrolyt in der gleichen Zeit auf nur 0,8 $mS/cm^2$. Die Konzentration an Valinomycin betrug jeweils 0,2 µg/ml. Der Mechanismus der Wirkung von Valinomycin ist gut bekannt, nicht zuletzt aufgrund der bekannten Molekülstruktur (vgl. S. 37). Valinomycin ist wie viele andere Ionophore von ringförmiger oder ringähnlicher Struktur. Es besitzt ein hydrophobes Äußeres und ein hydrophiles Inneres. Im hydrophilen Inneren wird pro Molekül Valinomycin ein $K^+$-Ion koordinativ gebunden. Die hydrophobe äußere Struktur von Valinomycin ermöglicht dem einfach positiv geladenen Valinomycin-$K^+$-Komplex, sich in der nichtpolaren Schicht einer Membran zu lösen und auf diese Art und Weise auch die Membran zu passieren.

Für das Verbrennungstoxin, d.h. für die Proteinkomponente aus verbrannter Haut sowie für das delip. Nativ-Protein aus unverbrannter Haut ergaben sich signifikante Leitfähigkeitsämderungen.

Es wurden zwei Aufarbeitungsfraktionen untersucht:

Fraktionen der Aufarbeitungsgruppe A ($A_I$, $A_{II}$) und Fraktionen der Aufarbeitungsgruppe N ($N_I$, $N_{II}$).
Zeigten sich innerhalb einer Aufarbeitungsgruppe unter den einzelnen Fraktionen keine Unterschiede in der Beeinflußung der Leitfähigkeitsänderung der Membran, so konnte hingegen zwischen den Aufarbeitungsgruppen A und N ein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Nach 30 Minuten war in der Gruppe A ein Leitfähigkeitsanstieg auf 2 $mS/cm^2$ für eine Nativ-Konzentration von 1 ug/ml erreicht, während für dieselbe Konzentration in der Gruppe N ein Leitfähigkeitsanstieg auf nur 0,9 $mS/cm^2$ erfolgte.
Weiterhin zeigte sich eine Konzentrationsabhängigkeit innerhalb der Gruppen. Eine zehnfach geringere Konzentration der Gruppe A (0,1 ug/ml) erbrachte nach 30 Minuten einen Leitfähigkeitsanstieg auf 0,56 $mS/cm^2$. Unter gleichen Bedingungen (30 min., 0,1 ug/ml) ergab sich für die Gruppe N ein Anstieg der Leitfähigkeit auf 0,3 $mS/cm^2$.

Für in einer Aufarbeitungsgruppe T gewonnenem Toxin aus verbrannter Haut ergab sich bei einer Konzentration von 1 ug/ml nach 30 Minuten ein Leitfähigkeitsanstieg auf 1,2 $mS/cm^2$.

Für das Wirkungsverhalten von nativem Precursor und Toxin aus verbrannter Haut kann gesagt werden, daß ihr Verhalten in Bezug auf eine Leitfähigkeitsänderung an einer künstlichen Membran gleich ist.
Dies würde auch die Aussage eines gleichen Ladungszustandes

von nativem Precursor und Toxin aus verbrannter Haut (das wie oben erwähnt ein Tri- oder Tetramer des nativen Precursors sein soll) bestätigen. Auch müßten Precursor und Verbrennungstoxin gleich sein in ihrer hydrophoben Wechselwirkung mit Membranen.
Auch hinsichtlich ihrer Kinetik zeigten beide Substanzen einen entsprechenden Verlauf. Beide bewirkten eine lineare Erhöhung der Membranleitfähigkeit. Ein sprunghaftes Ansteigen bzw. ein Ansteigen und sofortiges Wiederabsinken der Leitfähigkeit konnte nicht beobachtet werden, was in diesem Falle für einen "Offen-Zu"-Mechanismus von Kanälen sprechen könnte. Es zeigte sich eine konzentrationsabhängige Wirkung: Bei nur einem Zehntel der zugegebenen Konzentration der Toxine wurde eine Leitfähigkeitserhöhung auf nur 30 bis 40 % gegenüber der Ausgangskonzentration gemessen.
Die innerhalb eines Aufarbeitungsganges getesteten Fraktionen zeigten bezüglich der Erhöhung der Leitfähigkeit ein gleiches konzentrationsabhängiges Verhalten. Zwischen den Aufarbeitungsgängen ergaben sich jedoch signifikante Unterschiede. Das Nativ-Protein (Precursor) sowie das Toxin aus verbrannter Haut lagen in ihrer delipidierten Form vor. Wurden ihre lipidierten Vorläufer des jeweiligen Aufarbeitungsganges am Lipid-Bilayer getestet, so ergab sich keine Leitfähigkeitserhöhung.

Wäre aufgrund einer lipophilen Wechselwirkung der lipidierten Vorläufer der Hautproteine mit einer Lipid-Bilayer-Membran zu erwarten, so müßte auch festgestellt werden, daß diese Bedingung für einen Ionentransport durch einen Lipid-Bilayer allein nicht ausreicht. Das permeabilitätserhöhende Protein müßte gewissermaßen einen Kanal schaffen (vgl. Valinomycin), der einen Ionentransport zuläßt. Dies scheint bei

den nicht delipidierten Substanzen aus verbrannter wie auch aus unverbrannter Haut nicht der Fall zu sein.

### 3.1.3. Permeabilitätserhöhung am Lipid-Bilayer durch Meerschweinchenkomplement

Eine eindeutige Leitfähigkeitserhöhung ergab sich auch bei der Wechselwirkung der ox. Cholesterin-n-Dekan-Membran mit einem Meerschweinchenkomplementgemisch.
Zur Testung kam ein Meerschweinchenkomplementgemisch der Firma BEHRING, bestehend aus folgenden Bestandteilen:

1. Einem Ambozeptor, gewonnen durch Immunisierung von Kaninchen mit Hammelerythrozyten. Als Konservierungsmittel dient Natriumazid (1 g/l).
2. Konserviertes Hammelblut, bestehend aus drei Teilen Hammelblut und zwei Teilen Stabilisatorlösung.
3. Konserviertes Meerschweinchenkomplement, das zur Stabilisierung mit Kaliumsulfat, Borsäure und Magnesiumchlorid versetzt ist.
4. Lyophilisiertem Meerschweinchenkomplement, gewonnen aus frischem Serum gesunder Meerschweinchen.

Es konnte eine temperaturabhängige Wechselwirkung des Komplementlösungsansatzes mit dem Lipid-Bilayer gefunden werden. Meerschweinchenkomplement wurde im Wasserbad für 30 Minuten bei einmal 25°C, 40°C, 60°C und 80°C inkubiert und jeweils in einer Endkonzentration von 20 ul/ml an der Membran zugegeben.

Konnte mit einem bei 25°C inkubiertem Lösungsansatz eine signifikante Leitfähigkeitserhöhung mit steilem Anstieg zwischen der 20. und 30. Minute auf eine Leitfähigkeit von 2,1 $mS/cm^2$ erreicht werden, ergab der Komplementansatz bei 40°C nach 30

Minuten eine Leitfähigkeit von 1,7 mS/cm$^2$. Bei auf 60°C und auf 80°C erhitztem Komplementansatz hingegen waren keine signifikanten Erhöhungen der Leitfähigkeit zu registrieren. Die Erklärung der temperaturabhängigen Wirkung liegt wohl im Temperaturoptimum bis 40°C, während die Inkubation bei 60°C sowie bei 80°C zu einer Denaturierung der Komplementproteine geführt haben dürfte.

KINSKY et al. (23) zeigten, daß Lipide allein, auch in Lipid-Bilayer-Konfiguration, als "Substrat" für Komplement dienen und daß Zellmembrane nicht irgendeines spezifischen Rezeptors für Bestandteile der Komplementreihe bedürfen.

Die Permeabilitätserhöhung für verschiedene Substanzen durch Komplement geschieht durch Bildung von Kanälen in der Membran. In sog. Erythrozyten-Ghosts konnten RAMM und MAYER (36) markiertes natives Protein bringen. Die Wechselwirkung von Anti-Forssman-Antikörpern und einer großen Menge Meerschweinchenkomplement mit den präparierten Erythrozyten ergab eine selektive Durchlässigkeit der Erythrozytenmembran durch komplementinduzierte Kanäle für Ovalbumin, Hämoglobin und Humanalbumin. Die Kanäle ließen Ovalbumin und Hämoglobin hindurch, Humanalbumin hingegen konnte die Kanäle nicht passieren. Aufgrund des unterschiedlichen Molekulargewichts der verwendeten Substanzen gelang ihnen die Größenbestimmung der Kanäle: der Durchmesser liegt zwischen 55 und 100 Å. Weiterhin konnten sie eine Haltbarkeit der Kanäle für über 72 Stunden nachweisen. Das zytolytisch bzw. membranolytische Äquivalent scheint C 8 zu sein, unterstützt von C 9. BHAKDI et al. (5) beschreiben die Wechselwirkung des C 5b-9-Membrankomplexes noch genauer. Sie meinen, nicht der ganze C 5b-9-Komplex,

sondern nur ein proteaseresistenter Rest (mit sechs Hauptpolypeptiden von einem MG von 50 000, 45 000, 40 000, 38 000, 20 000 und 16 000) davon würde zur Bildung eines Trans-Membran-Komplement-Kanals ausreichen.

Durch bei 40°C inkubiertes Meerschweinchenkomplementgemisch zeigte sich schon unmittelbar nach Schwarzwerden der Membran ein leichter Anstieg der Leitfähigkeit, der dann immer stärker wurde. Das Gemisch aus konserviertem Hammelblut, Meerschweinchenkomplement und Ambozeptor wurde wahrscheinlich in diesem Fall durch Hitze aktiviert, bzw. es wurde das Temperaturoptimum für die bei den Komplementreaktionen notwendigen Enzyme erreicht. Der Lipid-Bilayer diente als Substrat für die Wechselwirkung.
Von einer Hitzeaktivierung von Komplement bei der Verbrennungskrankheit kann jedoch vermutlich wohl nicht ausgegangen werden, obgleich die eigentlich wirksamen hohen Temperaturen bei großflächigen Verbrennungen in tieferen Gewebeschichten anscheinend erst Stunden nach dem Verbrennungstrauma durch ein "Weiterbrennen" im Gewebe erreicht werden sollen.

### 3.1.4. Substanzen ohne Leitfähigkeitssteigerung an der ox. Cholesterin/n-Dekan-Membran

Wie oben schon angeführt, bewirken nichtdelipidiertes Homogenisat verbrannter Mäusehaut (vgl. S. 51) auch in Konzentrationen von 10 ug/ml, sowie flüchtige Substanzen aus verbrannter Haut (vgl. S. 52), Dialysate aus verbrannter und unverbrannter Haut (vgl. S. 52), sowie Lyophilisate aus verbrannter Haut (vgl. S. 52f.) keine Leitfähigkeitserhöhung an dem beschriebenen Lipid-Bilayer. Es wäre jedoch falsch zu behaupten, allein das Vorliegen eines delipidierten Proteins

würde ausreichen, um eine Leitfähigkeitserhöhung an einer künstlichen Membran zu bewirken. Es scheint ein spezifisches membranwirksames Protein erforderlich, das eine Leitfähigkeitserhöhung bewirkt.
Denaturiertes und auch natives delipidiertes Humanalbumin (vgl. S. 53) bewirkte selbst in Konzentrationen von 10 ug/ml keinen leitfähigkeitssteigernden Effekt am Lipid-Bilayer.
Ein permeabilitätssteigernder Effekt scheint somit weiterhin bestimmte Qualitäten der mit der Membran in Wechselwirkung tretenden Substanz vorauszusetzen.
Jedoch nicht nur die Beschaffenheit der die Membran "angreifenden" Substanz, sondern auch der Membranaufbau selbst entscheiden mit über eine Wechselwirkung mit oder ohne Permeabilitätserhöhung. Während in Messungen dieser Arbeit mit escherichia coli-Endotoxin an der ox. Cholesterin-n-Dekan-Membran keine Leitfähigkeitssteigerungen beobachtet wurden, ergaben sich bei anderen Membranzusammensetzungen hingegen (vgl. S. 40ff.) Leitfähigkeitsänderungen.

### 3.1.5. Escherichia coli-Endotoxin und Meerschweinchenkomplement

Wurden 0,1 ug/ml escherichia coli-Toxin mit bei 25°C inkubiertem Meerschweinchenkomplementgemisch (20 ul) auf die Wechselwirkung mit der Membran untersucht, so fand sich eine Leitfähigkeitserhöhung nach 30 Minuten auf 1,7 $mS/cm^2$. In diesem Fall wurde ein gegenüber Komplement bei 25°C anderes Ansteigen der Leitfähigkeitskurve beobachtet. War es im ersten Fall ein mehr sigmoider Verlauf der Kurve, so konnte nun eine parabelförmige Kurve ermittelt werden. War an der ox. Cholesterin-n-Dekan-Membran escherichia coli-Toxin nicht direkt wirksam, so läßt obiger Versuch an eine Aktivierung durch Komplement denken.

Allein die Endleitfähigkeit nach 30 Minuten erwies sich im "Nur-Komplementansatz" als höher.

### 3.1.6. Delipidiertes Nativ-Protein und Meerschweinchenkomplement

Wurde delipidiertes Nativ-Protein der Aufarbeitungsgruppe $A_I$ zusammen mit Meerschweinchenkomplement getestet, so ergab sich ebenfalls eine Leitfähigkeitserhöhung (auf 1,17 $mS/cm^2$), die jedoch um 0,6 $mS/cm^2$ niedriger lag als ohne Komplement. Durch diesen Versuch allein läßt sich jedoch noch nicht sagen, ob Komplement nun die Höhe der Wechselwirkung des delipidierten Nativ-Proteins herabsetzte, oder ob nur eine andere Kinetik der Wechselwirkungen erzielt wurde.
Das Nativ-Protein sowie das Protein aus verbrannter Haut zeigt eine Leitfähigkeitserhöhung an der Membran. Einerseits könnte man sich vorstellen, daß das Nativ-Protein bzw. das Protein aus verbrannter Haut direkt auf eine Lipid-Membran einwirken kann, andererseits könnte man sich eine Wirkung über das Komplement-System ebenfalls denken : das Komplementsystem, hier in diesem Falle als Koordinations- und Übertragungssystem für eine lytische Membranwirkung. Das Nativ-Protein bzw. Verbrennungstoxin würde unter Komplementverbrauch zum zytolytischen Agens. Die Hautproteine werden beim thermischen Trauma mehr oder weniger alteriert. Der Körper hat sich mit seinen Abwehrmechanismen damit auseinanderzusetzen. In den Zellen, den Gefäßen, den Geweben der Haut treten Alterationen auf. Diese sind insgesamt sehr komplex und vielgestaltig, so daß vom Organismus mehrere Reaktionsmechanismen in Gang gesetzt werden. MIEKKA und GOZZE (35) konnten zeigen, daß selbst mehrfaches, einfaches Pippetieren einer IgG-Lösung (bis zu

20 mal wurde pippetiert) eine Komplementaktivierung bewirkte. Wenn selbst solch ein Vorgang eine Komplementaktivierung bewirkt, kann zumindest wohl auch an eine Aktivierung von Komplement beim Verbrennungstrauma gedacht werden. Die Gewebsalterationen durch die thermisch bedingten Änderungen bieten sicher mannigfache Gelegenheiten für eine mögliche Aktivierung. In vivo scheint jedoch eine Aktivierung des Komplementsystems vor allem bei pathologisch veränderter Gleichgewichtslage des gesamten Systems, ähnlich dem System der Blutgerinnung mit dem phyiologischen Wechselspiel zwischen Gerinnung und Fibrinolyse, möglich.

### 3.2. Delip. Nativ-Protein (Precursor) und Toxin aus verbrannter Haut.
### Aufbau und Wirkmechanismus am Lipid-Bilayer

Die einzelnen Fraktionen der Aufarbeitungsgänge A und N zeigten innerhalb eines Aufarbeitungsganges keine unterschiedlichen Leitfähigkeitsänderungen am Lipid-Bilayer. Die Fraktionen des Aufarbeitungsganges A hingegen waren deutlich mehr leitfähigkeitssteigernd. Geht man davon aus, daß eine Wechselwirkung der Hautproteine am Lipid-Bilayer nur von deren Delipidierungszustand abhängt, ließe sich für die Aufarbeitungsgruppe A mit besserer Leitfähigkeitserhöhung folgern, daß hier die Delipidierung gründlicher erfolgte. Die Fähigkeit des delipidierten Toxin-Proteins aus verbrannter Haut, die Lipid-Bilayer-Leitfähigkeit zu erhöhen, lag im Betrag zwischen den Werten der beiden Aufarbeitungsgänge A und N mit nativem Hautprotein. Es scheint somit, daß im wesentlichen die Art der Aufarbeitung der Haut im jeweiligen Trennungsgang entscheidet, inwieweit das Endprodukt die Fähigkeit zur

Leitfähigkeitserhöhung besitzt. Es kann also nicht gesagt werden, daß das Toxin aus verbrannter Haut die Leitfähigkeit stärker erhöht als der native Precursor aus unverbrannter Haut. SCHUBERT et al. (54) zeigten ebenfalls proteininduzierte Leitfähigkeitsänderungen am Lipid-Bilayer. Bei diesen Untersuchungen wurden zwei aus menschlichen Erythrozytenmembranen isolierte Proteinfraktionen A und B getestet. Die chemische Analyse der beiden Fraktionen erbrachte eine nahezu identische Zusammensetzung. Der einzige Unterschied der Fraktion A bestand in deren niedrigem Aggregationszustand. Es konnte gezeigt werden, daß große Leitfähigkeitsänderungen an einen niedrigen Aggregationszustand des Proteins gebunden sind.
Im Hinblick auf die unterschiedlichen Leitfähigkeiten des nativen Precursors und des Verbrennungstoxins dieser Arbeit könnte man für das Protein des Aufarbeitungsganges A und T (aus verbrannter Haut) einen niedrigeren Aggregationszustand erwarten als für den Aufarbeitungsgang N, der wie oben erwähnt ja nur eine geringere Leitfähigkeitserhöhung bewirkte.

### 3.3. Nativer Precursor, Verbrennungstoxin und Komplement

Für einen gegenüberstellenden Vergleich der aus nativer oder verbrannter Haut isolierten Proteine mit den einzelnen Komplementfaktoren (vgl. auch S. 15 ) reichen die doch leider über den nativen Precursor und das Verbrennungstoxin nur spärlich vorhandenen Kennzeichen kaum aus, um eine Identität mit den Komplementfaktoren aufzuzeigen oder abzulehnen. Ähnliches gilt auch für die Syntheseorte der einzelnen Komplementfaktoren (vgl. S. 54ff.). Es kann bis heute kein ausschließlicher Syntheseort im Sinne eines anatomischen Organs

oder Gewebes für die Komplementfaktoren angegeben werden. Auch fehlen Beweise für eine mögliche Bindung einzelner Komplementfaktoren an Gewebe der Haut. Ein möglicher Zusammenhang zwischen Komplementsystem und feingeweblichem Aufbau der Haut kann allenfalls vermutet werden. Auffallenderweise können bei den sog. Kollagenkrankheiten Hautveränderungen sowie auch Veränderungen der Serum-Komplementfaktoren beobachtet werden: Beim Bild des Lupus Erythematodes werden C 1q, C 1r, C 1s, C 2, C 4, C 5- sowie C 7-Defekte beobachtet. Bei der Sklerodermie ist ein C 7-Defekt beschrieben, während es bei der Dermatomyositis zu C 2- und C 4-Defekten kommt. Beim Lupus Erythematodes ist es vor allen Dingen eine erhebliche Verminderung der 3. Komplementkomponente in Kombination mit einer Verminderung der 4. Komplementkomponente, die als solche nicht nur bei der visceralen Form, sondern auch beim diskoiden, also nur auf die Haut beschränktem Erythematodes gefunden wird.
Hitzedenaturiertes Kollagen zeigte im Tierversuch keine Toxizität (vgl. S. 8f.). Hautveränderungen mit geringem Kollagengehalt scheinen deren Toxizität noch zu erhöhen. Die Toxinisolierung aus männlicher Haut, die einen größeren Kollagenanteil besitzt, erweist sich schwieriger als aus weiblicher Haut. Es scheint somit eine negative Korrelation zwischen Kollagen und Toxinbildung zu existieren. Eine Beziehung zwischen Hautproteinen, Kollagen und Komplementsystem kann bis heute jedoch leider nur vermutet werden. Ein Vergleich mit dem nativen Precursor (MG $10^5$) und einem möglicherweise ähnlichen Komplementfaktor bleibt zunächst auf das Molekulargewicht beschränkt. Vergleiche: C 1s (MG: $1{,}1 \cdot 10^5$ bis $1{,}2 \cdot 10^5$; $\alpha$-Globulin). ERBS et al. (10)

konnten jedoch bei starken Verbrennungen eine Erhöhung der α-Globulin-Fraktion in den ersten Wochen auf das zwei- bis dreifache beobachten.

### 3.4. Möglichkeiten der Aktivierung von Verbrennungstoxin

Generell lassen sich folgende Möglichkeiten der Verbrennungstoxinwirkung denken:

1.) Nativer Precursor und/oder Verbrennungstoxin wirken aufgrund ihrer physikochemischen Struktur direkt zytolytisch.
2.) Das Verbrennungstoxin bzw. ein nativer Precursor wirkt direkt oder unter Mitwirkung von Cofaktoren auf C 3 ein und aktiviert dieses. Somit wäre im Sinne eines "alternate pathway" die Komplementkaskade aktiviert, die mittels ihres C 5 - C 9-Komplexes membranolytisch wirken könnte.
3.) Der aus der Haut isolierte Precursor oder das Verbrennungstoxin ist mit Komplementfaktoren assoziiert, wobei die assoziierten Komplementfaktoren in den Faktoren I - III jeweils identisch sind. Der Unterschied in den Proteinfaktoren bestünde dann nur im jeweils assoziierten Proteinanteil.

zu 1.):
Hier wäre die Voraussetzung u.a. in einer hydrophoben Wechselwirkung des Precursors/Toxins mit Lösung nicht kovalenter Bindungen im Lipid-Bilayer und evtl. Micellenbildung zu suchen. Über diesen Mechanismus scheint teilweise letztlich der C 5 - 9-Komplex ebenfalls zytolytisch zu wirken. In diesem Fall wäre jedoch eine direkte Wirkung zwischen Precursor und "Erfolgszelle" bzw. Membran vorhanden. Dies wäre eine Erklärung der toxischen Wirkung der bei der Verbrennung ent-

stehenden bzw. freigesetzten Stoffe. Diese Möglichkeit erscheint jedoch wenig wahrscheinlich, da ja gerade die delipidierten Proteine der Haut leitfähigkeitssteigernd an der Membran sind.

zu 2.):

Hier könnte man sich vorstellen, daß das Verbrennungstoxin bzw. sein nativer Precursor wie Dextran, Inulin, Agar sowie Zymosan und Endotoxin mittels Cofaktoren auf C 3PA einwirken, wobei dieser zum C 3-Aktivator konvertiert wird, welcher dann seinerseits C 3 aktiviert. Wie schon erwähnt, wurde im Serum von Menschen, Kaninchen und Meerschweinchen ein Protein entdeckt, das C 3 aktivieren kann, selbst aber keine C-Komponente darstellt. Dieses Protein ist in seiner nativen Form inert und wird als C 3-Proaktivator bezeichnet (vgl. S. 71). Man könnte sich vorstellen, daß der native Precursor und/oder das Toxin C 3PA direkt, als auch durch Vermittlung weiterer Serumfaktoren in seine gegenüber C 3 aktive Form überführt. Dieser C 3-Aktivator wirkt dann auf C 3 analog zum C 42-Enzym ein:

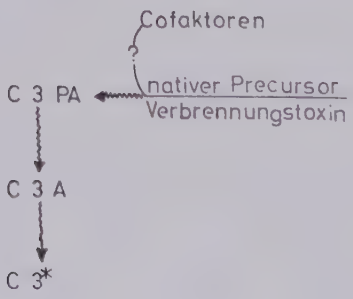


Abb. 37

Vom aktivierten C 3* erfolgt die Weiterentwicklung wie beim

klassischen Aktivierungsvorgang und führt letztendlich zum zytolytisch wirksamen C 5b- C 9-Komplex.
MAYER (31) hält nur die Anwesenheit eines C 5b- 9-Komplexes für notwendig für eine folgende Zytolyse. Er beschreibt zwei Modelle der komplementabhängigen Zytolyse.
Das sog. "leaky-patch model", das entweder einen direkten enzymatischen Angriff oder die enzymatische Bildung einer zytolytischen Substanz durch den C 5b- 9-Komplex fordert. Es wird ein "Loch" in der Membran gebildet, das Wasser und Ionen durchläßt, jedoch nur in der Zeit der enzymatischen Reaktion besteht. Es ist also kein über einen längeren Zeitraum stabiles "Loch".
Ein zweites Modell, genannt "doughnut model", beschreibt eine stabile und hohle Ring-Struktur mit einem hydrophoben Äußeren und einem hydrophilen Inneren. Das hydrophile Innere bildet gewissermaßen einen Kanal durch die Membran, der Wasser und Ionen einen freien Austausch in Bezug auf die beiden Membranseiten gewährt. Das molekulare Korrelat dieser Ringstruktur stellt der Komplement-Komplex C 5b-9 dar. Eine Kombination dieser beiden Modelle stellt für den Autor den sinnvollsten Mechanismus dar. Die Kanäle, die durch den C 5b - 9-Komplex geformt werden, haben einen Durchmesser von 100 Å und eine Tiefe von 75 bis 90 Å. Unterschiedliche Komplementarten bilden auch unterschiedliche Kanäle. Vorstehende Abmessungen gelten für Kanäle, die durch Humankomplement gebildet werden. Für Meerschweinchenkomplement fand sich ein Durchmesser von nur 85 bis 95 Å.

HAMMER et al. (16) bestätigten diese Hypothese. Sie konnten zeigen, daß die hydrophoben Polypeptidketten der C 5b und C 7

Untereinheiten des C 5b67-Komplexes in die Bilayer-Membran eingebaut werden mit gleichzeitiger Bindung von C 8 und C 9 an diesen Komplex und der Bildung eines offenen Kanals durch die Membran.

MICHAELS et al. (33) zeigten ein Ansteigen der Ionenleitfähigkeit eines Lipid-Bilayers mit gereinigten Komplementfaktoren. Der C 5b67-Komplex sowie die Faktoren C 7 und C 8 bewirkten einen leichten Leitfähigkeitsanstieg. Nachfolgende Zugabe von Komplementfaktor C 9 beschleunigte die Leitfähigkeitserhöhung. Hieraus folgern die Autoren eine nahezu identische Wechselwirkung des C 5b - 9-Komplexes mit künstlichen Membranen wie mit biologischen Membranen. Die Wirksamkeit des C 5b - 9-Komplexes war abhängig von der Reihenfolge, in der die einzelnen Komplementfaktoren zugegeben wurden. Weiterhin beobachteten sie ein unterschiedliches elektrisches Verhalten der Membran nach Wechselwirkung mit dem C 5b - 8-Komplex einerseits und dem C 5b - 9-Komplex andererseits. Ihre Messungen stellen insgesamt eine weitere Bestätigung der Hypothese einer stabilen Tunnelbildung durch die Membran, verursacht durch Komplement dar.

Nach Zugabe von C 5b, C 6 und C 7 wurde keine Leitfähigkeitserhöhung beobachtet. Nach weiterer Zugabe von C 8 begann die Leitfähigkeit der Membran mit einer Latenzzeit von zwei bis zehn Minuten anzusteigen. Die Autoren beobachteten eine Leitfähigkeitsänderung um das 2- bis 10-fache. Eine Dosis-Wirkungs-Beziehung konnte nicht ermittelt werden. Weitere Zugabe von C 9 erhöhte die Leitfähigkeit noch einmal um das 1,5- bis 4-fache. Diese Leitfähigkeitserhöhungen konnten nur an Bilayer-Membranen beobachtet werden. Ein Effekt an dickeren Membranen blieb aus. Die vorstehenden Versuche wurden jeweils

mit Meerschweinchenkomplement durchgeführt. Wurde als Komplementvorstufen humanes C 5 und humanes C 6 benutzt, ergab sich bei einer weiteren Zugabe von C 7, C 8 und C 9 kein Leitfähigkeitsanstieg. Weiterhin konnten die Autoren eine von Spannungspulsen abhängige Leitfähigkeit zeigen.
Wurde zusätzlich eine Spannung angelegt, erhöhte sich die Leitfähigkeit, bei Rücknahme der Spannung ging die Leitfähigkeit wieder zurück, lag jedoch über der ursprünglichen Leitfähigkeit. Hiermit konnte gezeigt werden, daß die Kanäle bzw. ihre Ionenleitfähigkeit von einem angelegten elektrischen Feld abhängig sind.
In einer anschließenden Arbeit konnte MICHAELS et al. (34) die zytolytisch wirksame Komplementfolge noch genauer beschreiben.
Zwei Reaktionsgruppen, nämlich C 5b6 und C 7 sowie C 5b - 8 und C 9 sind für die Membranwirkung verantwortlich. Die Reaktion der einzelnen Komplementfaktoren innerhalb der Gruppen setzt die Anwesenheit dieser Faktoren auf einer Seite der Membran voraus. Eine Wechselwirkung der oben genannten Gruppen hingegen ist jedoch möglich, auch wenn die Gruppen jeweils auf der Gegenseite der Membran liegen. Dies zeigt, daß die Wechselwirkung der Gruppen wohl innerhalb des Lipid-Bilayers stattfindet. Weiterhin zeigten sie am 35 bis 45 Å dünnen ox. Cholesterin-Bilayern, daß eine einzelne Zugabe der Faktoren C 5b, C 6 oder C 9 die Permeabilität langsam steigert. Die gleichzeitige Zugabe aller Komplementfaktoren hingegen führte zu keinem Leitfähigkeitsanstieg. Die kooperative Wechselwirkung einer 60 Å dicken Lecithin-Membran, die mithilft, den C 5b - 9-Komplex zu bilden, zeigt sich ebenfalls bei "ultradünnen" (35 bis 45 Å dicken) Membranen.
Während in dieser Arbeit ein kontinuierlicher Leitfähigkeitsanstieg bei Komplementgemischzugabe beobachtet wurde, be-

schrieben MICHAELS et al. weiterhin ein schrittweises Ansteigen der Leitfähigkeit bei Zugabe von Komplementuntereinheiten. Der C 5b-Komplex soll für Kanäle von 6 Å Durchmesser, C 5b67 für 12 Å, C 5b - 8 für 16 Å und C 5b - 9 für 25 Å dicke Kanäle verantwortlich sein.
Die Hypoproteinämie im Serum, die STUCKE (vgl. S. 16) nach großflächigen Verbrennungen beschreibt, könnte mit einer Hypokomplementämie oder Verringerung wenigstens eines für die Reaktionssequenz notwenigen Komplementfaktors einhergehen. Ein Mangel an für die Aktivierung notwenigen Cofaktoren wäre ebenfalls zu diskutieren.
Mit der Erholung des Organismus, viele Patienten sind schon vor Eintritt des unerwarteten Spättodes der Verbrennungskrankheit zum Teil in gutem Allgemeinzustand und scheinen "über den Berg" zu sein, wäre eine Erholung des Komplementsystems mit etwaiger Hyperproteinämie bzw. Hyperkomplementämie zu fordern, die dann die zur Verbrennungstoxin-Komplementreaktion erforderlichen Parameter zur Verfügung stellt.
ERBS, MÜLLER und OPFERKUCH (10) stellten in klinischen Messungen bei Patienten mit ausgedehnten tiefen Verbrennungen kurz nach dem thermischen Trauma eine mäßige, in den folgenden Wochen eine deutliche Erhöhung der Komplementreaktivität fest. Sie untersuchten zwei Patientengruppen: Eine Gruppe I mit Patienten, deren Haut bis zu 20 % der Körperoberfläche mit zweit- und drittgradigen Verbrennungen geschädigt war und eine Gruppe II mit Patienten, deren Haut mit ebenfalls zweit- und drittgradigen Verbrennungen von jedoch mehr als 20 % der Körperoberfläche geschädigt war. Bei beiden Gruppen war die $\alpha_1$-Globulin-Fraktion in den ersten Wochen auf das zwei- bis dreifache erhöht. Bei den sehr schwer verbrannten Patienten der Gruppe II wurde ein allmählicher Anstieg des Gesamtkomplements und

der einzelnen Komplementkomponenten im Laufe der ersten Woche der Erkrankung festgestellt. C 2, C 3c und C 4 waren von Anfang an erhöht, während C 1 auch in der 3. Woche noch nicht den Normalwert erreichte. Die Aktivität von C 1 war in den ersten Wochen um die Hälfte vermindert. Die Autoren vermuten eine Abwehrreaktion des Organismus gegenüber denaturiertem Eiweiß oder gegen eine bakterielle Infektion als Ursache der Komplementvermehrung.

Bemerkenswert ist der hohe Anteil der $\alpha$ -Fraktion der Globuline, der in den ersten Wochen auf das zwei- bis dreifache erhöht ist. Gerade dieser Globulin-Fraktion nämlich gehört das letzte Glied der Komplementreihe, das membranolytisch wirkende C 9 an. HAMMER et al. (16, 17) konnten erythrozytengebundenes C 9 mittels SDS (Sodium dodecylsulfat), welches u.a. auch im oben beschriebenen Trennungsgang der Hautaufarbeitung nach SCHOENENBERGER gebraucht wird, herauszulösen. Ein Herauslösungsversuch mit EDTA-NaCl-Lösung hingegen gelang nicht. Weiterhin konnten sie mittels "enzymatischem stripping" und Elutionsmessungen zeigen, daß sich zellgebundenes C 9 wie ein integriertes Membranprotein verhält. Falls C 9 einen Bestandteil natürlicher Membranen darstellt, könnte daraus auf eine Analogie oder eventuell Identität zu dem aus der Haut isolierten nativen Precursor geschlossen werden.

Durch das Verbrennungstrauma würde dann aus Hautmembranen entweder sofort oder erst allmählich C 9 freigesetzt und zu einem posttraumatisch erhöhten C 9 bzw. $\alpha$-Globulin-Spiegel führen. Dieser erhöhte C 9-Pool würde dann nach "Erholung" des übrigen Komplementsystems C 9 im Überschuß zur Verfügung stellen können, das dann als Endglied der Komplementkaskade fungieren kann. Viele C 5b - 9-Komplexe könnten dann schlagartig zu

Zellschäden und somit zu Gewebs- bzw. zu Organschäden, wenn nicht überhaupt zum Spättod beim Verbrennungstrauma führen. Diese Hypothese würde jedoch zur Voraussetzung haben, daß die Komplementfaktoren C 1 - C 8 entweder vermindert oder in ihrer Aktivität geschwächt sind, bzw. würde auch ein Komplementfaktor ausreichen, der zu einem Stop in der Komplementkaskade führt. Nach ERBS et al. (11) sind beim Menschen nach dem Verbrennungstrauma die Werte von C 2, C 3c und C 4 gleich nach dem Trauma jedoch erhöht. Dies würde obiger Überlegung jedoch nicht widersprechen, da ERBS et al. eine starke Verminderung der C 1-Aktivität, also eine Verminderung nur eines Komplementfaktors, auch in der dritten Woche nach dem Verbrennungstrauma noch fanden. Eine verminderte C 1-Aktivität würde den klassischen Weg der Komplementaktivierung entweder unmöglich machen oder wenigstens quantitativ erschweren.

zu 3.):
Die Vorstellung, der native Precursor oder das Toxin seien entweder identisch mit den Komplementfaktoren oder mit ihnen assoziiert, wäre ebenfalls denkbar.
Bei Aufarbeitung der Haut werden wie oben beschrieben sämtliche Schichten der Haut, also auch gefäßführende Schichten mit aufgearbeitet. Trotz Ammoniumsulfatfällung könnten u.a. Serumproteine in den aufgearbeiteten Fraktionen vorhanden sein. Die Serumkonzentration von C 3 beim Menschen liegt beispielsweise bei 1 200 ug/ml (vgl. ROITT (37)).

## 4. Zusammenfassung

Der bei der Verbrennungskrankheit beobachtete plötzliche Spättod wird in Verbidnung gebracht mit einem bei der Verbrennung in der Haut entstandenen Verbrennungstoxin oder einem auch in unverbrannter Haut vorliegenden nativen Protein, genannt Precursor, das lediglich durch den Verbrennungsvorgang freigesetzt werden soll.

Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt nun in der Untersuchung des Verhaltens des nativen Precursors.
Als Parameter zur näheren Charakterisierung des nativen Precursors werden Wechselwirkungen an natürlichen Membranen (menschlichen Erythrozyten) sowie an künstlichen Membranen (Lipid-Bilayer) herangezogen. Im Vergleich mit Substanzen mit bekannter Wechselwirkung mit Membranen werden u.a. Stoffe wie Valinomycin und Komplement verwendet. Eine ähnliche Wirkung von nativem Precursor, Verbrennungstoxin und Komplement wird beschrieben.

Es konnte gezeigt werden, daß die verschiedenen Aufarbeitungsfraktionen des nativen Hautproteins (Precursors) an menschlichen Erythrozyten hämolytisch wirken und innerhalb der einzelnen Fraktionen keine unterschiedliche hämolytische Wirkung entfalten. Eine Beeinflußung der Erythrozytenhämolyse erfolgt nur durch unterschiedliche Konzentrationen des nativen Hautproteins.
Am Lipid-Bilayer als Modell einer künstlichen Membran wurde eine Unterscheidung der in dem Trennungsgang aufgearbeiteten Hautproteine versucht. Es wurden zwei Aufarbeitungsgänge A und N untersucht. Mit Proben aus beiden Aufarbeitungsgängen aus der nativen Haut konnten konzentrationsabhängige Permeabilitätsänderungen erzielt werden.

Unterschieden sich die Permeabilitätsänderungen innerhalb eines Aufarbeitungsganges nur hinsichtlich der Konzentrationen, so konnte gezeigt werden, daß zwischen den Aufarbeitungsgruppen A und N ein deutlicher Permeabilitätsunterschied zu erzielen war.
Die Gruppe A zeigte eine stärkere Permeabilitätssteigerung, was auf einen stärkeren Delipidierungsgrad des nativen Proteins in der Gruppe A zurückzuführen ist.
Ein Vergleich der Leitfähigkeitssteigerungen mit dem Verbrennungstoxin, also mit einem Protein aus verbrannter Haut, ergab ein Leitfähigkeitsverhalten an den künstlichen Membranen, welches zwischen den Aufarbeitungsgruppen A und N liegt.

Es konnte somit gezeigt werden, daß membranleitfähigkeitssteigernde Substanzen sowohl aus verbrannter als auch aus unverbrannter Haut isoliert werden können. Der native Precursor aus unverbrannter Haut wirkt wie das Verbrennungstoxin aus verbrannter Haut leitfähigkeitssteigernd.

Eine spezifische leitfähigkeitssteigernde Wirkung der Proteine aus verbrannter sowie aus unverbrannter Haut konnte u.a. im Vergleich zu Humanalbumin wie auch zu e. coli-Endotoxin gezeigt werden, die beide in viel höheren Konzentrationen nicht leitfähigkeitssteigernd wirken.
Weiterhin konnte eine dem nativen Precursor ähnliche leitfähigkeitssteigernde Wirkung von Komplement gezeigt werden.

Art und Kinetik der Leitfähigkeitsänderungen von Komplement und nativem Precursor lassen einen Zytolysemechanismus durch die Komplementkaskade für möglich erscheinen.

Aufgrund der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen läßt das entsprechende Verhalten von nativem Precursor und Verbrennungstoxin bei Membranwechselwirkungen somit an einen allgemeinen Wirkmechanismus u.a.

über die Komplementkaskade und nicht an eine spezifische Wirkung von Toxin aus verbrannter Haut denken.

## 5. Literatur

1. ALLGÖWER, M., C. BURRI, L. CUENI, F. ENGLEY, H. FLEISCH, U.F. GRUBER, F. HARDER and R.G.G. RUSSELL:
Study of burn toxins.
N.Y. Acad. Sci. 150, 807 - 815 (1968).

2. BENZ, R. and B.F. GISIN:
Influence of membrane structures in ion transport through lipid bilayer membranes.
J. Membrane Biol. 40, 293 - 314 (1978).

3. BENZ, R., G. STARK, K. JANKO and P. LAUGER:
Valinomycin-mediated ion transport through neutral lipid membranes: influence of hydrocarbon chain length and temperature.
J. Membrane Biol. 14, 339 - 364 (1973).

4. BERNHEIMER, A.W.:
Interactions between membranes and cytolytic bacterial toxins.
Biochemica et Biophysica Acta, 344, 27 - 50 (1974).

5. BHAKDI, S., J. TRANUM-JENSEN and O. KLUMP:
The terminal membrane C 5b - 9 complex of human complement. Evidence for the existence of multiple protease-resistant polypeptides that form the trans-membrane complement channel.
Journal of Immunology Vol. 124, No. 5, 2451 - 2457 (1980).

6. BURRI, B. und M. ALLGÖWER:
Die toxische Wirkung steriler, verbrannter Haut bei Mäusen verschiedener Stämme.
Schweiz. Med. Wochenschrift 94, 560 - 563 (1964).

7. CHAET, A.B. and M. ALBERT:
Evidence for the toxic factor-theory.
Fed. Proc. 17 (1), 24 (1958).

8. CUENI, L.B., M. ALLGÖWER und G.A. SCHOENENBERGER:
Isolierung und physikalisch-chemische Charakterisierung eines Verbrennungstoxins aus der Mäusehaut.
Z. Ges. Exp. Med. 156, 110 - 128 (1971).

9. ELDRIDGE, Ch.A. and H.J. MOROWITZ:
Histograms of conductance fluctuations induced by alamethicin in black lipid membranes.
Biochemical and Biophysical Research Communications Vol. 85 (1), 264 - 272 (1978).

10. ERBS, G., F.E. MÜLLER und W. OPFERKUCH:
Der Einfluß der Verbrennungskrankheit auf das Komplement-System.
Fortschr. Med. 98. Jahrgang, Nr.11, 397 - 399 (1980).

11. ERMISHKIN, L.N., K.M. KASUMOV and V.M. POTSELVYE:
Properties of amphotericin B channels in a lipid bilayer.
Biochemica et Biophysica Acta 470, 357 - 367 (1977).

12. FEIGENSON, G.W. and P.R. MEERS:
$^{1}H$ NMR study of valinomycin conformation in a phospho-lipid bilayer.
Nature Vol. 283, 313 - 314 (1980).

13. FETTIPLACE, R., D.M. ANDREWS and D.A. HAYDON:
The thickness, composition and structure of some bilayers and natural membranes.
J. Membrane Biol. 5, 277 - 296 (1971).

14. GREUER, W.:
Ist die Intoxikationstheorie der Verbrennung als widerlegt zu betrachten?
in BRUNS' Beitr. klin. Chirurgie 180, 493 - 496 (1949).

15. HADDING, W., D. BITTER-SUERMANN and W. KÖNIG:
Action of guinea pig C 8 and C 9: determination of the component causing membrane damage.
Immunochemistry 7, 860 (1970).

16. HAMMER, C.H., A. NICHOLSON and M.M. MAYER:
On the mechanism of cytolysis by complement: evidence on insertion of C 5 and C 7 subunits of the C 5b, 6, 7 complex into the phospholipid bilayer of erythrocyte membranes.
Proc. Nat. Acad. Sci. 72, 5076 - 5080 (1975).

17. HAMMER, C.H., M.L. SHIN, A.S. ABRAMOVITZ and M.M. MAYER:
On the mechanism of cell membrane damage by complement. Evidence on insertion of polypeptide chains from C 8 and C 9 into the lipid bilayer of erythrocytes.
Journal of Immunol. 119, 1 - 8 (1977).

18. HAXBY, J.A., O. GÖTZE, H.J. MÜLLER-EBERHARD and S.C. KINSKY:
Release of trapped marker from liposomes by the action of purified complement components.
Proc. Nat. Acad. Sci. 64, 290 - 295 (1969).

19. HESKETH, T.R., S.N. PAYNE and J.H. HUMPHREY:
Complement and phospholipase c lysis of lipid membranes.
Immunology 23, 705 - 711 (1972).

20. HESKETH, T.R., R.R. DOURMASHKIN, S.N. PAYNE, J.H. HUMPHREY and P.J. LACHMANN:
Lesions due to complement in lipid membranes.
Nature Vol. 233, 619 - 623 (1971).

21. HUNTER, F.R., S.R. ROSENTHAL, A.S. HUNTER, F.J. FINAMORE and R. INZA-NELL:
Pathogenesis of death due to burns. Material released from the burned skin of rats.
American Physiological Society Vol. 14, 77 (1955).

22. INOVE, K.I. and S.C. KINSKY:
Fate of phospholipids in liposomal model membranes damaged by antibody and complement.
Biochemistry Vol. 9, No. 24, 4767 - 4776 (1970).

23. KINSKY, S.C., J.A. HAXBY, D.A. ZOPF, C.R. ALVING and C.B. KINSKY:
Complement-dependent damage to liposomes prepared from pure lipids and Forssman Hapten.
Biochemistry Vol. 8, No. 10, 4149 - 4158 (1969).

24. KOLB, W.P. and H.J. MÜLLER-EBERHARD:
The membrane attack mechanism of complement. verification of a stable C 5 - C 9 complex in free solution.
J. Exp. Med. 138, 438 - 451 (1873).

25. KOLB, W.P. and H.J. MÜLLER-EBERHARD:
The membrane attack mechanism of complement in isolation and subunit composition of the C 5b - 9 complex.
J. Exp. Med. 141, 724 - 735 (1975).

26. KNOLL, W. and G. STARK:
Temperature-jumps experiments on thin lipid membranes in the presence of valinomycin.
J. Membrane Biol. 37, 13 - 28 (1977).

27. KOSLOWSKI, L.:
Autolysekrankheiten in der Chirurgie.
Stuttgart: Thieme 1959.

28. KOSLOWSKI, L.:
Kälte- und Wärmeschaden; in
KOSLOWSKI, IRMER, BUSCHE: Lehrbuch der Chirurgie,
1. Auflage, Stuttgart: Schattauer 1978, 7 - 14.

29. LÄUGER, R. and G. STARK:
Kinetics of carrier-mediated ion transport across lipid bilayer membranes.
Biochemica et Biophysica Acta 211, 458 - 466 (1970).

30. LEVITT, D.G., S.R. ELIAS and J.M. HAUTMAN:
Number of water molecules coupled to the transport of sodium, potassium and hydrogen ions via gramicidin, nonactin or valinomycin.
Biochemica et Biophysica Acta 512, 436 - 451 (1978).

31. MAYER, M.M.:
Mechanism of cytolysis by complement.
Proc. Nat. Acad. Sci. 69, 2954 - 2958 (1972).

32. MENESTRIA, G. and R. ANTOLINI:
A different kind of hemicyanin channel in oxidized cholesterol membranes.
Biochemical and Biophysical Research Communications Vol. 88 (2), 433 - 439 (1979).

33. MICHAELS, D.W., A.S. ABRAMOVITZ, C.H. HAMMER and M.M. MAYER:
Increased ion permeability of planar lipid bilayer membranes after treatment with the C 5b - 9 cytolytic attack mechanism of complement.
Proc. Nat. Acad. Sci. 73, 2852 - 2856 (1976).

34. MICHAELS, D.W., A.S. ABRAMOVITZ, C.H. HAMMER and M.M. MAYER:
Characterization of the complement lesion: the formation of trans-membrane channels and their mechanism of assembly.
Journal of Immunology 120, 1785 (1978).

35. MIEKKA, S.I. and I. GOZZE:
Anticomplementary activity of human immunoglobulin G.
I. Mechanism of artifactual increase in anticomplementary activity of IgG during the assay.
Vox. Sang. 29, 101 - 123 (1975).

36. RAMM, L.E. and M.M. MAYER:
Life-span and size of the trans-membrane channel formed by large doses of complement.
Journal of Immunology Vol. 124, 2281 - 2287 (1980).

37. ROITT, J.:
Essential Immunology, Third Edition Oxford:
Blackwell Scientific Publications 1977, 138, 143.

38. ROSENTHAL, S.R.:
Neutralisation of histamine and burn toxin.
Ann. of Surgery 106, 258 - 265 (1937).

39. ROSENTHAL, S.R., W.A. SPURRIER and H. TRAHAN:
Specificity of thermal and radiation (beta)"toxins" of the skin.
Fed. Proc. 17, 1, 135 (1958).

40. ROSENTHAL, S.R., J.B. HARTNEY and W.A. SPURRIER:
The "toxin-antitoxin" phenomenon in burned and injured human subjects.
J. A.M.A. Vol. 174, 957 - 965 (1960).

41. ROSENTHAL, S.R., W.A. SPURRIER and A.B. GOODMAN:
"Toxin-antitoxin" phenomena in injured animals and man (thermal, radiation and physical injury).
Fed. Proc. 19; 195, 135 (1960).

42. ROSENTHAL, S.R., P.L. HAWLEY and A.A. HAKIM:
Purified burn toxin factor and its competition.
Surgery Vol. 71 (4), 527 - 536 (1972).

43. ROSENTHAL, S.R., F.J. FINAMORE, F.R. HUNTER and A.D. WILLIAMS:
Toxic factors in burns.
Fed. Proc. 15; 508, 156 - 157 (1956).

44. ROTHER, K., U. HADDING und G. TILL:
Komplement, Biochemie und Pathologie.
Darmstadt: Steinkopff 1974, S. 8ff, 33ff, 61ff, 71ff.

45. SCHAGINA, L., A.E. GRINFELDT and A.A. LEV:
Interaction of cation fluxes in gramicidin A channels in lipid bilayer membranes.
Nature 273, 243 - 244 (1978).

46. SCHINDLER, H.-G. und J.P. ROSENBUSCH:
Matrix protein from escherichia coli outer membranes forms voltage-controlled channels in lipid bilayers.
Proc. Nat. Acad. Sci. 75 (8), 3751 - 3755 (1978).

47. SCHMIDT, K.-H.:
Veränderungen der molekularen Struktur der Haut unter der Einwirkung thermischer Energie und ihre Bedeutung für das Verbrennungssyndrom.
Habilitationsschrift, Tübingen 1977.

48. SCHMIDT, K.-H., J. SCHÖLMERICH, B. KREMER, W. HELLER und L. KOSLOWSKI:
Studies on the structure and biological effects of pyrotoxins purified from burned skin.
World J. Surg. 3, 361 - 365 (1979).

49. SCHÖLMERICH, J., B. KREMER und K.-H. SCHMIDT:
Zur Pathogenese der Verbrennungskrankheit. Untersuchungen an der isoliert perfundierten Rattenleber.
Acta Chirurgica Austriaca 6, 159 - 166 (1977).

50. SCHÖLMERICH, J., K.-H. SCHMIDT, B. KREMER, Y. HAGMEIER, H. MASTARI und S. HERMAWAN:
Leberstoffwechselveränderungen nach standardisierter Hautverbrennung und intraperitonealer Injektion eines aus verbrannter Mäusehaut isolierten Verbrennungstoxins. Versuche an der isoliert perfundierten Rattenleber.
Chirurgisches Forum 77 für experimentelle und klinische Forschung, Heidelberg: Springer 1977.

51. SCHOENENBERGER, G.A.:
Burn toxins isolated from mouse and human skin. Their characterization and immuntherapy effects.
Monogr. Allergy Vol. 9, 72 - 139 (1975).

52. SCHOENENBERGER, G.A., L.B. CUENI, U. BAUER, U. EPPENBERGER and M. ALLGÖWER:
Isolation and characterization of a toxic lipid-protein complex formed in mouse skin by controlled thermal energy. Comparison to an inactive precursor derivied from thermally unexposed or nativ skin.
Biochemica et Biophysica Acta 263, 149 - 163 (1972).

53. SCHOENENBERGER, G.A., U. BAUER, L.B. CUENI, U. EPPENBERGER, K. STÄDLER and M. ALLGÖWER:
Physical, chemical and biological properties of a specific toxic lipid protein complex formed in thermally altered mouse skin.
Biochemica et Biophysica Acta 263, 164 - 177 (1972).

54. SCHUBERT, D., H. BLEUEL, B. DOMNING and G. WIEDNER:
Protein-induced conductivity changes in black lipid membranes and protein aggregation.
Febs. Lett. 74, 47 - 49 (1977).

55. SCHIN, M.L., W.A. PAZNEKAS and M.M. MAYER:
On the mechanism of membrane damage by complement: the effect of length and unsaturation of the acyl chains in liposomal bilayers and the effect of cholesterol concentration in sheep erythrocyte and liposomal membranes.
Journal of Immunology 120, 1996 - 2002 (1978).

56. SHIN, M.L., W.A. PAZNEKAS, A.S. ABRAMOVITZ and M.M. MAYER:
On the mechanism of membrane damage by complement. Exposure of hydrophobic sites on activated C-proteins.
Journal of Immunology 119, 1358 - 1364 (1977).

57. SHUN-SCHINELLA, C.K., J.W. STANFORD, J. GREENBERG, F.J. ANNECCHIARIC and Ch.L. FOX Jr.:
Toxic factors and proteolytic enzyms in burns.
Ann. NY. Acad. Sci. 150, 816 - 822 (1968).

58. STARK, G., R. BENZ, G.W. POHL and K. JANKO:
Valinomycin as a probe for the study of structural changes of black lipid membranes.
Biochemica et Biophysica Acta 266, 603 - 612 (1972).

59. TOSTESON, M.T. and D.C. TOSTESON:
Bilayers containing gangliosides develop channels when exposed to cholera toxin.
Nature 275, 142 - 144 (1978).

60. VINCENT, J.P., M. BALERNA and M. LAZDUNSKI:
Properties of association of cardiotoxin with lipid vesicles and natural membranes.
Febs. Lett. 85, 103 - 108 (1978).

61. WEISS, Ch.:
Funktion des Blutes; in:
SCHMIDT, R.F., G. THEWS:
Physiologie des Menschen, 20. Aufl., Berlin:
Springer 1980, S. 328f. .

62. WOBSCHALL, D. and C. McKEON:
Step conductance increases in bilayer membranes induced by antibody-antigen-complement action.
Biochemica et Biophysica Acta 413, 317 - 321 (1975).

## 6. Tabellenanhang

Erklärung:

| | |
|---|---|
| t in Minuten | Zeit nach Zugabe der zu prüfenden Substanz |
| Strom I in nA | Strom an der ox. Cholesterin/n-Dekan-Membran |
| $\lambda(mScm^{-2})$: | Leitfähigkeit $\lambda$ der ox. Cholesterin/n-Dekan-Membran in $mScm^{-2}$ |
| arithmetisches Mittel : | $\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^{k} x_i^* \cdot n_i$ |
| Varianz: | $s_\lambda^2 = \frac{1}{n-1} \cdot \sum_{i=1}^{n} (x_i - \bar{x})^2$ |
| Standardabweichung: | $s_\lambda = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^{n} (x_i - \bar{x})^2}$ |

0,2 ug/ml Valinomycin in 1 n KCl

| | t in Minuten | Strom I in nA | $\lambda$ (mS cm$^{-2}$) |
|---|---|---|---|
| 1 | 2 | 880 | 9,0 |
| | 5 | 2700 | 28,6 |
| | 10 | 5780 | 61,3 |
| | 15 | 8700 | 92,0 |
| | 20 | 12300 | 130,0 |
| | 25 | 17000 | 180,0 |
| | 30 | 20100 | 213,0 |
| 2 | 2 | 1020 | 10,8 |
| | 5 | 2500 | 26,5 |
| | 10 | 5520 | 58,5 |
| | 15 | 11200 | 118,0 |
| | 20 | 12100 | 128,0 |
| | 25 | 15000 | 159,0 |
| | 30 | 18900 | 200,0 |
| 3 | 2 | 790 | 8,3 |
| | 5 | 2300 | 24,0 |
| | 10 | 5900 | 62,0 |
| | 15 | 7500 | 79,0 |
| | 20 | 10000 | 106,0 |
| | 25 | 15000 | 159,0 |
| | 30 | 16000 | 169,0 |
| 4 | 2 | 1070 | 11,0 |
| | 5 | 3000 | 31,0 |
| | 10 | 5660 | 60,0 |
| | 15 | 9400 | 99,0 |
| | 20 | 14000 | 148,0 |
| | 25 | 19000 | 201,0 |
| | 30 | 20000 | 212,0 |
| 5 | 2 | 940 | 9,9 |
| | 5 | 2500 | 26,0 |
| | 10 | 5750 | 61,0 |
| | 15 | 9220 | 97,0 |
| | 20 | 11900 | 126,0 |
| | 25 | 15900 | 168,0 |
| | 30 | 19800 | 210,0 |
| $\bar{x}$ | 2 | 940 | 9,8 |
| | 5 | 2600 | 27,2 |
| | 10 | 5722 | 60,6 |
| | 15 | 9204 | 97,0 |
| | 20 | 12060 | 127,6 |
| | 25 | 16380 | 173,4 |
| | 30 | 18960 | 200,8 |
| $s_\lambda^2$ | 2 | | 1,068 |
| | 5 | | 5,710 |
| | 10 | | 1,470 |
| | 15 | | 158,800 |
| | 20 | | 178,200 |
| | 25 | | 249,800 |
| | 30 | | 274,900 |
| $s_\lambda$ | 2 | | 1,150 |
| | 5 | | 2,670 |
| | 10 | | 1,350 |
| | 15 | | 14,080 |
| | 20 | | 14,900 |
| | 25 | | 17,600 |
| | 30 | | 18,500 |

0,2 ug / ml Valinomycin in 1 n NaCl

| | t in Minuten | Strom I in nA | $\gamma$ (mS · cm$^{-2}$) |
|---|---|---|---|
| 1 | 2 | 6,0 | 0,064 |
| | 5 | 12,0 | 0,13 |
| | 10 | 13,5 | 0,14 |
| | 15 | 18,0 | 0,19 |
| | 20 | 24,0 | 0,25 |
| | 25 | 120,0 | 1,27 |
| | 30 | 165,0 | 1,75 |
| 2 | 2 | 6,0 | 0,064 |
| | 5 | 15,0 | 0,16 |
| | 10 | 21,0 | 0,22 |
| | 15 | - | - |
| | 20 | 56,0 | 0,59 |
| | 25 | 75,0 | 0,80 |
| | 30 | 80,0 | 0,84 |
| 3 | 2 | 9,0 | 0,096 |
| | 5 | 12,0 | 0,13 |
| | 10 | 13,5 | 0,14 |
| | 15 | 18,0 | 0,19 |
| | 20 | 114,0 | 1,21 |
| | 25 | 126,0 | 1,34 |
| | 30 | 130,0 | 1,38 |
| 4 | 2 | 7,5 | 0,089 |
| | 5 | 12,0 | 0,13 |
| | 10 | 17,0 | 0,18 |
| | 15 | 19,0 | 0,20 |
| | 20 | 28,0 | 0,30 |
| | 25 | 37,0 | 0,39 |
| | 30 | 49,0 | 0,52 |
| 5 | 2 | 6,6 | 0,07 |
| | 5 | 6,0 | 0,064 |
| | 10 | 12,0 | 0,13 |
| | 15 | 18,0 | 0,19 |
| | 20 | 22,0 | 0,23 |
| | 25 | 38,0 | 0,40 |
| | 30 | 42,0 | 0,45 |
| 6 | 2 | 3,6 | 0,04 |
| | 5 | 7,5 | 0,08 |
| | 10 | 11,4 | 0,12 |
| | 15 | 30,0 | 0,32 |
| | 20 | 30,0 | 0,32 |
| | 25 | 35,0 | 0,37 |
| | 30 | 43,0 | 0,46 |
| 7 | 2 | 6,0 | 0,064 |
| | 5 | 13,0 | 0,14 |
| | 10 | 36,0 | 0,38 |
| | 15 | 60,0 | 0,64 |
| | 20 | 150,0 | 1,59 |
| | 25 | 157,0 | 1,66 |
| | 30 | - | - |

| | t in Minuten | Strom I in nA | $\Lambda$ (mS cm$^{-2}$) |
|---|---|---|---|
| x | 2 | 6,4 | 0,069 |
| | 5 | 11,1 | 0,120 |
| | 10 | 17,8 | 0,190 |
| | 15 | 40,4 | 0,290 |
| | 20 | 60,6 | 0,640 |
| | 25 | 84,0 | 0,890 |
| | 30 | 85,0 | 0,900 |
| $s^2_\Lambda$ | 2 | | 0,0003 |
| | 5 | | 0,0100 |
| | 10 | | 0,0072 |
| | 15 | | 0,0269 |
| | 20 | | 0,2520 |
| | 25 | | 0,2440 |
| | 30 | | 0,2490 |
| $s_\Lambda$ | 2 | | 0,0184 |
| | 5 | | 0,0342 |
| | 10 | | 0,0917 |
| | 15 | | 0,1790 |
| | 20 | | 0,5420 |
| | 25 | | 0,5330 |
| | 30 | | 0,5470 |

0,10 ug / ml e.coli - Endotoxin in 1 n NaCl

| | t in Minuten | Strom I in nA | $\lambda$(mS cm$^{-2}$) |
|---|---|---|---|
| 1 | 2 | 4,5 | 0,047 |
| | 5 | 10,5 | 0,110 |
| | 10 | 11,4 | 0,120 |
| | 15 | - | - |
| | 20 | - | - |
| | 25 | - | - |
| | 30 | - | - |
| 2 | 2 | 9,0 | 0,095 |
| | 5 | 12,0 | 0,127 |
| | 10 | 18,0 | 0,190 |
| | 15 | 20,0 | 0,216 |
| | 20 | 21,0 | 0,220 |
| | 25 | - | - |
| | 30 | - | - |
| 3 | 2 | 9,9 | 0,105 |
| | 5 | 11,4 | 0,121 |
| | 10 | 17,4 | 0,184 |
| | 15 | 21,0 | 0,220 |
| | 20 | 23,4 | 0,248 |
| | 25 | - | - |
| | 30 | - | - |
| 4 | 2 | 9,6 | 0,101 |
| | 5 | 9,9 | 0,105 |
| | 10 | 10,5 | 0,111 |
| | 15 | 10,5 | 0,111 |
| | 20 | 11,4 | 0,121 |
| | 25 | 15,3 | 0,162 |
| | 30 | - | - |
| 5 | 2 | 7,5 | 0,079 |
| | 5 | 9,0 | 0,095 |
| | 10 | 9,6 | 0,101 |
| | 15 | 12,0 | 0,127 |
| | 20 | 13,2 | 0,140 |
| | 25 | 14,4 | 0,152 |
| | 30 | 15,0 | 0,159 |
| 6 | 2 | 15,0 | 0,159 |
| | 5 | 21,0 | 0,222 |
| | 10 | 21,0 | 0,222 |
| | 15 | 21,0 | 0,222 |
| | 20 | 22,0 | 0,235 |
| | 25 | 22,0 | 0,235 |
| | 30 | 22,0 | 0,235 |
| $\bar{x}$ | 2 | 9,3 | 0,098 |
| | 5 | 12,3 | 0,130 |
| | 10 | 14,6 | 0,154 |
| | 15 | 16,9 | 0,179 |
| | 20 | 18,2 | 0,193 |
| | 25 | 17,2 | 0,183 |
| | 30 | 18,5 | 0,197 |

| | t in Minuten | | $\lambda$ (mS $cm^{-2}$) |
|---|---|---|---|
| $s^2_\lambda$ | 2 | | 0,0011 |
| | 5 | | 0,0180 |
| | 10 | | 0,0021 |
| | 15 | | 0,0024 |
| | 20 | | 0,0027 |
| | 25 | | 0,0013 |
| | 30 | | 0,0014 |
| $s_\lambda$ | 2 | | 0,0366 |
| | 5 | | 0,0464 |
| | 10 | | 0,0502 |
| | 15 | | 0,0552 |
| | 20 | | 0,0581 |
| | 25 | | 0,0453 |
| | 30 | | 0,0537 |

10 ug/ml e.coli - Endotoxin in 1 n NaCl

| | t in Minuten | Strom I in nA | $\lambda$ (mS cm$^{-2}$) |
|---|---|---|---|
| 1 | 2 | 5,4 | 0,057 |
| | 5 | 5,7 | 0,060 |
| | 10 | 6,0 | 0,063 |
| | 15 | 6,3 | 0,067 |
| | 20 | 6,0 | 0,063 |
| | 25 | 6,9 | 0,073 |
| | 30 | 6,3 | 0,067 |
| 2 | 2 | 4,5 | 0,047 |
| | 5 | 3,6 | 0,038 |
| | 10 | 4,5 | 0,047 |
| | 15 | 5,4 | 0,057 |
| | 20 | 5,4 | 0,057 |
| | 25 | 6,0 | 0,063 |
| | 30 | - | - |
| 3 | 2 | 3,0 | 0,032 |
| | 5 | 4,5 | 0,047 |
| | 10 | 4,8 | 0,051 |
| | 15 | 5,4 | 0,057 |
| | 20 | 6,0 | 0,063 |
| | 25 | - | - |
| | 30 | - | - |
| 4 | 2 | 7,8 | 0,083 |
| | 5 | 7,8 | 0,083 |
| | 10 | 7,8 | 0,083 |
| | 15 | 8,3 | 0,088 |
| | 20 | 8,5 | 0,090 |
| | 25 | 8,5 | 0,090 |
| | 30 | - | - |
| 5 | 2 | 5,3 | 0,057 |
| | 5 | 5,7 | 0,058 |
| | 10 | 5,4 | 0,054 |
| | 15 | 6,0 | 0,061 |
| | 20 | 6,6 | 0,063 |
| | 25 | 7,5 | 0,021 |
| | 30 | 8,4 | 0,089 |
| $\bar{x}$ | 2 | 5,4 | 0,057 |
| | 5 | 5,4 | 0,057 |
| | 10 | 5,7 | 0,058 |
| | 15 | 6,3 | 0,067 |
| | 20 | 6,5 | 0,068 |
| | 25 | 7,2 | 0,076 |
| | 30 | 7,3 | 0,078 |
| $s_\lambda^2$ | 2 | | 0,0003 |
| | 5 | | 0,0002 |
| | 10 | | 0,0002 |
| | 15 | | 0,0001 |
| | 20 | | 0,0001 |
| | 25 | | 0,00 |
| | 30 | | 0,0001 |
| $s_\lambda$ | 2 | | 0,0185 |
| | 5 | | 0,0167 |
| | 10 | | 0,0141 |
| | 15 | | 0,0128 |
| | 20 | | 0,0128 |
| | 25 | | 0,0050 |
| | 30 | | 0,0157 |

1 ug/ml delip. Nativprotein $N_I$

| | t in Minuten | Strom I in nA | $\lambda$ (mS cm$^{-2}$) |
|---|---|---|---|
| 1 | 2 | 5,0 | 0,053 |
| | 5 | 17,0 | 0,106 |
| | 10 | 22,0 | 0,283 |
| | 15 | 30,0 | 0,318 |
| | 20 | 39,0 | 0,414 |
| | 25 | 66,0 | 0,700 |
| | 30 | 93,0 | 0,987 |
| 2 | 2 | 7,0 | 0,074 |
| | 5 | 19,0 | 0,201 |
| | 10 | 29,0 | 0,307 |
| | 15 | 35,0 | 0,371 |
| | 20 | 41,0 | 0,435 |
| | 25 | 69,0 | 0,732 |
| | 30 | 107,0 | 1,136 |
| 3 | 2 | 2,0 | 0,021 |
| | 5 | 15,0 | 0,159 |
| | 10 | 23,0 | 0,244 |
| | 15 | 31,0 | 0,329 |
| | 20 | 40,0 | 0,424 |
| | 25 | 59,0 | 0,626 |
| | 30 | 71,0 | 0,753 |
| 4 | 2 | 11,0 | 0,116 |
| | 5 | 21,0 | 0,223 |
| | 10 | 26,0 | 0,276 |
| | 15 | 39,0 | 0,414 |
| | 20 | 51,0 | 0,541 |
| | 25 | 64,0 | 0,679 |
| | 30 | - | - |
| 5 | 2 | 6,0 | 0,063 |
| | 5 | 11,0 | 0,116 |
| | 10 | 21,0 | 0,223 |
| | 15 | 29,0 | 0,308 |
| | 20 | 41,0 | 0,435 |
| | 25 | 53,0 | 0,562 |
| | 30 | 79,0 | 0,838 |
| $\bar{x}$ | 2 | 6,2 | 0,065 |
| | 5 | 16,6 | 0,176 |
| | 10 | 24,2 | 0,266 |
| | 15 | 32,8 | 0,348 |
| | 20 | 42,4 | 0,449 |
| | 25 | 62,2 | 0,659 |
| | 30 | 87,5 | 0,928 |
| $s_\lambda^2$ | 2 | | 0,0009 |
| | 5 | | 0,0020 |
| | 10 | | 0,0008 |
| | 15 | | 0,0015 |
| | 20 | | 0,0021 |
| | 25 | | 0,0035 |
| | 30 | | 0,0213 |
| $s_\lambda$ | 2 | | 0,0345 |
| | 5 | | 0,0512 |
| | 10 | | 0,0331 |
| | 15 | | 0,0440 |
| | 20 | | 0,0517 |
| | 25 | | 0,0669 |
| | 30 | | 0,1687 |

1 ug/ml delip. Nativprotein $N_{II}$

| | t in Minuten | Strom I in nA | $\lambda$ (mS cm$^{-2}$) |
|---|---|---|---|
| 1 | 2 | 1,5 | 0,016 |
| | 5 | 12,0 | 0,127 |
| | 10 | 28,5 | 0,302 |
| | 15 | 37,5 | 0,398 |
| | 20 | 48,0 | 0,509 |
| | 25 | 57,0 | 0,605 |
| | 30 | 67,5 | 0,716 |
| 2 | 2 | 7,6 | 0,080 |
| | 5 | 21,0 | 0,223 |
| | 10 | 48,0 | 0,509 |
| | 15 | 53,0 | 0,562 |
| | 20 | 59,0 | 0,626 |
| | 25 | 65,0 | 0,690 |
| | 30 | 74,0 | 0,785 |
| 3 | 2 | 6,2 | 0,066 |
| | 5 | 27,0 | 0,286 |
| | 10 | 41,0 | 0,435 |
| | 15 | 42,0 | 0,445 |
| | 20 | 53,0 | 0,562 |
| | 25 | 55,0 | 0,583 |
| | 30 | 61,0 | 0,647 |
| 4 | 2 | 3,8 | 0,040 |
| | 5 | 15,0 | 0,160 |
| | 10 | 17,0 | 0,180 |
| | 15 | 18,0 | 0,191 |
| | 20 | 27,0 | 0,286 |
| | 25 | 39,0 | 0,414 |
| | 30 | 51,0 | 0,541 |
| 5 | 2 | 4,9 | 0,052 |
| | 5 | 8,8 | 0,093 |
| | 10 | 19,0 | 0,201 |
| | 15 | 21,0 | 0,223 |
| | 20 | 23,0 | 0,244 |
| | 25 | 35,0 | 0,372 |
| | 30 | 61,0 | 0,647 |
| $\bar{x}$ | 2 | 4,8 | 0,051 |
| | 5 | 16,7 | 0,155 |
| | 10 | 30,7 | 0,325 |
| | 15 | 34,3 | 0,364 |
| | 20 | 42,0 | 0,445 |
| | 25 | 50,2 | 0,533 |
| | 30 | 62,9 | 0,667 |
| $s^2_\lambda$ | 2 | | 0,0005 |
| | 5 | | 0,0092 |
| | 10 | | 0,0166 |
| | 15 | | 0,0193 |
| | 20 | | 0,0232 |
| | 25 | | 0,0145 |
| | 30 | | 0,0066 |
| $s_\lambda$ | 2 | | 0,0245 |
| | 5 | | 0,1070 |
| | 10 | | 0,1439 |
| | 15 | | 0,1555 |
| | 20 | | 0,1704 |
| | 25 | | 0,1345 |
| | 30 | | 0,0908 |

0,1 ug/ml delip. Nativprotein $N_{II}$

| | t in Minuten | Strom I in nA | $\gamma$ (mS cm$^{-2}$) |
|---|---|---|---|
| 1 | 2 | 4,0 | 0,042 |
| | 5 | 8,0 | 0,085 |
| | 10 | 12,0 | 0,127 |
| | 15 | 16,0 | 0,169 |
| | 20 | 21,0 | 0,223 |
| | 25 | 30,0 | 0,318 |
| | 30 | 36,0 | 0,382 |
| 2 | 2 | 3,0 | 0,032 |
| | 5 | 7,0 | 0,074 |
| | 10 | 10,2 | 0,108 |
| | 15 | 13,0 | 0,138 |
| | 20 | 19,0 | 0,207 |
| | 25 | 22,0 | 0,233 |
| | 30 | 25,0 | 0,265 |
| 3 | 2 | 2,0 | 0,021 |
| | 5 | 5,0 | 0,053 |
| | 10 | 9,0 | 0,095 |
| | 15 | 17,0 | 0,180 |
| | 20 | 23,0 | 0,244 |
| | 25 | 26,0 | 0,276 |
| | 30 | 27,0 | 0,287 |
| 4 | 2 | 4,5 | 0,048 |
| | 5 | 8,5 | 0,090 |
| | 10 | 11,0 | 0,117 |
| | 15 | 13,2 | 0,140 |
| | 20 | 21,0 | 0,223 |
| | 25 | 29,0 | 0,307 |
| | 30 | 31,0 | 0,329 |
| 5 | 2 | 6,0 | 0,063 |
| | 5 | 8,8 | 0,093 |
| | 10 | 12,0 | 0,127 |
| | 15 | 16,5 | 0,175 |
| | 20 | 21,0 | 0,223 |
| | 25 | 27,0 | 0,286 |
| | 30 | 35,0 | 0,371 |
| $\bar{x}$ | 2 | 3,9 | 0,041 |
| | 5 | 7,4 | 0,079 |
| | 10 | 10,8 | 0,115 |
| | 15 | 15,1 | 0,160 |
| | 20 | 21,0 | 0,224 |
| | 25 | 26,8 | 0,284 |
| | 30 | 30,8 | 0,327 |
| $s_{\gamma}^2$ | 2 | | 0,0002 |
| | 5 | | 0,0002 |
| | 10 | | 0,0001 |
| | 15 | | 0,0003 |
| | 20 | | 0,0001 |
| | 25 | | 0,0008 |
| | 30 | | 0,0020 |
| $s_{\gamma}$ | 2 | | 0,0159 |
| | 5 | | 0,0162 |
| | 10 | | 0,0136 |
| | 15 | | 0,0199 |
| | 20 | | 0,0131 |
| | 25 | | 0,0329 |
| | 30 | | 0,0510 |

1 ug/ml delip. Nativprotein $A_I$

| | t in Minuten | Strom I in nA | $\lambda$ (mS cm$^{-2}$) |
|---|---|---|---|
| 1 | 2 | 3,0 | 0,031 |
| | 5 | 9,0 | 0,095 |
| | 10 | 18,0 | 0,191 |
| | 15 | 90,0 | 0,955 |
| | 20 | 120,0 | 1,270 |
| | 25 | 153,0 | 1,620 |
| | 30 | 180,0 | 1,910 |
| 2 | 2 | 8,0 | 0,084 |
| | 5 | 12,0 | 0,127 |
| | 10 | 36,0 | 0,382 |
| | 15 | 73,0 | 0,774 |
| | 20 | 117,0 | 1,240 |
| | 25 | 162,0 | 1,710 |
| | 30 | 253,0 | 2,680 |
| 3 | 2 | 7,0 | 0,074 |
| | 5 | 18,0 | 0,191 |
| | 10 | 45,0 | 0,477 |
| | 15 | 72,0 | 0,764 |
| | 20 | 85,0 | 0,902 |
| | 25 | 139,0 | 1,470 |
| | 30 | 199,0 | 2,110 |
| 4 | 2 | 3,2 | 0,033 |
| | 5 | 55,0 | 0,583 |
| | 10 | 98,0 | 1,018 |
| | 15 | 138,0 | 1,460 |
| | 20 | 168,0 | 1,780 |
| | 25 | 179,0 | 1,900 |
| | 30 | 270,0 | 2,860 |
| $\bar{x}_i$ | 2 | 5,3 | 0,055 |
| | 5 | 23,5 | 0,249 |
| | 10 | 49,3 | 0,469 |
| | 15 | 93,2 | 0,988 |
| | 20 | 122,5 | 1,298 |
| | 25 | 158,3 | 1,675 |
| | 30 | 225,5 | 2,390 |
| $s^2_\lambda$ | 2 | | 0,0005 |
| | 5 | | 0,0383 |
| | 10 | | 0,0534 |
| | 15 | | 0,0799 |
| | 20 | | 0,0983 |
| | 25 | | 0,0242 |
| | 30 | | 0,1534 |
| $s_\lambda$ | 2 | | 0,0274 |
| | 5 | | 0,2262 |
| | 10 | | 0,2669 |
| | 15 | | 0,3265 |
| | 20 | | 0,3620 |
| | 25 | | 0,1797 |
| | 30 | | 0,4523 |

0,1 ug/ml delip. Nativprotein $A_I$

| | t in Minuten | Strom I in nA | $\lambda$ (mS $cm^{-2}$) |
|---|---|---|---|
| 1 | 2 | 4,0 | 0,042 |
| | 5 | 8,0 | 0,085 |
| | 10 | 17,0 | 0,180 |
| | 15 | 23,0 | 0,244 |
| | 20 | 31,0 | 0,329 |
| | 25 | 40,0 | 0,425 |
| | 30 | 55,0 | 0,583 |
| 2 | 2 | 5,0 | 0,053 |
| | 5 | 9,0 | 0,095 |
| | 10 | 15,0 | 0,159 |
| | 15 | 24,0 | 0,255 |
| | 20 | 33,0 | 0,350 |
| | 25 | 43,0 | 0,456 |
| | 30 | 56,0 | 0,594 |
| 3 | 2 | 3,0 | 0,032 |
| | 5 | 5,0 | 0,053 |
| | 10 | 10,0 | 0,106 |
| | 15 | 19,0 | 0,202 |
| | 20 | 29,0 | 0,308 |
| | 25 | 38,0 | 0,403 |
| | 30 | 49,0 | 0,520 |
| 4 | 2 | 3,0 | 0,032 |
| | 5 | 7,0 | 0,074 |
| | 10 | 17,0 | 0,180 |
| | 15 | 25,0 | 0,265 |
| | 20 | 29,0 | 0,308 |
| | 25 | 36,0 | 0,382 |
| | 30 | 50,0 | 0,531 |
| 5 | 2 | 4,0 | 0,042 |
| | 5 | 5,0 | 0,053 |
| | 10 | 15,0 | 0,159 |
| | 15 | 23,0 | 0,244 |
| | 20 | 28,0 | 0,297 |
| | 25 | 30,0 | 0,318 |
| | 30 | 53,0 | 0,563 |
| $\bar{x}$ | 2 | 3,8 | 0,040 |
| | 5 | 6,8 | 0,072 |
| | 10 | 14,8 | 0,156 |
| | 15 | 22,8 | 0,242 |
| | 20 | 30,0 | 0,318 |
| | 25 | 37,4 | 0,396 |
| | 30 | 52,6 | 0,558 |
| $s_\lambda^2$ | 2 | | 0,0001 |
| | 5 | | 0,0002 |
| | 10 | | 0,0007 |
| | 15 | | 0,0004 |
| | 20 | | 0,0003 |
| | 25 | | 0,0021 |
| | 30 | | 0,0008 |
| $s_\lambda$ | 2 | | 0,0087 |
| | 5 | | 0,0188 |
| | 10 | | 0,0302 |
| | 15 | | 0,0240 |
| | 20 | | 0,0211 |
| | 25 | | 0,0518 |
| | 30 | | 0,0320 |

1 ug/ml delip. Nativprotein $A_{II}$

| | t in Minuten | Strom I in nA | $\lambda$ (mS cm$^{-2}$) |
|---|---|---|---|
| 1 | 2 | 13,0 | 0,138 |
| | 5 | 32,0 | 0,339 |
| | 10 | 57,0 | 0,605 |
| | 15 | 85,0 | 0,902 |
| | 20 | 105,0 | 1,115 |
| | 25 | 145,0 | 1,540 |
| | 30 | 170,0 | 1,800 |
| 2 | 2 | 7,0 | 0,074 |
| | 5 | 35,0 | 0,372 |
| | 10 | 60,0 | 0,637 |
| | 15 | 75,0 | 0,796 |
| | 20 | 98,0 | 1,040 |
| | 25 | 135,0 | 1,430 |
| | 30 | 162,0 | 1,720 |
| 3 | 2 | 6,0 | 0,064 |
| | 5 | 29,0 | 0,307 |
| | 10 | 59,0 | 0,626 |
| | 15 | 79,0 | 0,838 |
| | 20 | 95,0 | 1,008 |
| | 25 | 138,0 | 1,465 |
| | 30 | 178,0 | 1,887 |
| 4 | 2 | 14,0 | 0,148 |
| | 5 | 31,0 | 0,329 |
| | 10 | 59,0 | 0,626 |
| | 15 | 88,0 | 0,934 |
| | 20 | 120,0 | 1,273 |
| | 25 | 141,0 | 1,490 |
| | 30 | 173,0 | 1,830 |
| 5 | 2 | 19,0 | 0,201 |
| | 5 | 36,0 | 0,382 |
| | 10 | 61,0 | 0,647 |
| | 15 | 91,0 | 0,966 |
| | 20 | 115,0 | 1,220 |
| | 25 | 139,0 | 1,475 |
| | 30 | 167,0 | 1,750 |
| $\bar{x}$ | 2 | 11,8 | 0,125 |
| | 5 | 32,6 | 0,346 |
| | 10 | 59,2 | 0,628 |
| | 15 | 83,6 | 0,887 |
| | 20 | 106,6 | 1,131 |
| | 25 | 139,6 | 1,480 |
| | 30 | 170,0 | 1,798 |
| $s^2_\lambda$ | 2 | | 0,0025 |
| | 5 | | 0,0007 |
| | 10 | | 0,0002 |
| | 15 | | 0,0038 |
| | 20 | | 0,0129 |
| | 25 | | 0,0012 |
| | 30 | | 0,0035 |
| $s_\lambda$ | 2 | | 0,0566 |
| | 5 | | 0,0309 |
| | 10 | | 0,0156 |
| | 15 | | 0,0695 |
| | 20 | | 0,1137 |
| | 25 | | 0,0401 |
| | 30 | | 0,0665 |

1 ug/ml Toxin aus verbrannter Haut

| | t in Minuten | Strom I in nA | $\lambda$ (mS $cm^{-2}$) |
|---|---|---|---|
| 1 | 2 | 12,0 | 0,127 |
| | 5 | 21,0 | 0,223 |
| | 10 | 35,0 | 0,371 |
| | 15 | 40,0 | 0,424 |
| | 20 | 70,0 | 0,743 |
| | 25 | 85,0 | 0,902 |
| | 30 | 115,0 | 1,220 |
| 2 | 2 | 16,0 | 0,169 |
| | 5 | 25,0 | 0,265 |
| | 10 | 28,0 | 0,297 |
| | 15 | 41,0 | 0,435 |
| | 20 | 73,0 | 0,775 |
| | 25 | 79,0 | 0,838 |
| | 30 | 101,0 | 1,070 |
| 3 | 2 | 19,0 | 0,201 |
| | 5 | 27,0 | 0,286 |
| | 10 | 31,0 | 0,329 |
| | 15 | 53,0 | 0,562 |
| | 20 | 87,0 | 0,870 |
| | 25 | 91,0 | 0,966 |
| | 30 | 128,0 | 1,350 |
| 4 | 2 | 15,0 | 0,159 |
| | 5 | 21,0 | 0,223 |
| | 10 | 70,0 | 0,318 |
| | 15 | 47,0 | 0,499 |
| | 20 | 70,0 | 0,743 |
| | 25 | 85,0 | 0,902 |
| | 30 | 110,0 | 1,160 |
| 5 | 2 | 12,0 | 0,127 |
| | 5 | 24,0 | 0,254 |
| | 10 | 38,0 | 0,403 |
| | 15 | 40,0 | 0,424 |
| | 20 | 72,0 | 0,764 |
| | 25 | 85,0 | 0,902 |
| | 30 | 105,0 | 1,110 |
| $\bar{x}$ | 2 | 14,8 | 0,157 |
| | 5 | 23,6 | 0,250 |
| | 10 | 82,4 | 0,344 |
| | 15 | 44,2 | 0,469 |
| | 20 | 73,4 | 0,779 |
| | 25 | 85,0 | 0,902 |
| | 30 | 111,8 | 1,182 |
| $s_\lambda^2$ | 2 | | 0,0007 |
| | 5 | | 0,0006 |
| | 10 | | 0,0015 |
| | 15 | | 0,0029 |
| | 20 | | 0,0022 |
| | 25 | | 0,0016 |
| | 30 | | 0,0096 |
| $s_\lambda$ | 2 | | 0,0311 |
| | 5 | | 0,0273 |
| | 10 | | 0,0428 |
| | 15 | | 0,0607 |
| | 20 | | 0,0527 |
| | 25 | | 0,0452 |
| | 30 | | 0,1094 |

10 ul/ml Homolysat verbrannter Mäusehaut

| | t in Minuten | Strom I in nA | $\chi$ (mS cm$^{-2}$) |
|---|---|---|---|
| 1 | 2 | 24,0 | 0,254 |
| | 5 | 24,0 | 0,254 |
| | 10 | 24,0 | 0,254 |
| | 15 | 23,0 | 0,244 |
| | 20 | 27,0 | 0,286 |
| | 25 | 27,0 | 0,286 |
| | 30 | 27,0 | 0,286 |
| 2 | 2 | 27,0 | 0,286 |
| | 5 | 30,0 | 0,318 |
| | 10 | 33,0 | 0,318 |
| | 15 | 36,9 | 0,391 |
| | 20 | 38,4 | 0,404 |
| | 25 | 38,7 | 0,404 |
| | 30 | 33,0 | 0,350 |
| 3 | 2 | 24,0 | 0,254 |
| | 5 | 22,0 | 0,238 |
| | 10 | 27,0 | 0,286 |
| | 15 | 24,0 | 0,254 |
| | 20 | 25,0 | 0,270 |
| | 25 | 25,0 | 0,270 |
| | 30 | 25,0 | 0,270 |
| 4 | 2 | 30,0 | 0,318 |
| | 5 | 30,0 | 0,318 |
| | 10 | 30,0 | 0,318 |
| | 15 | 36,0 | 0,382 |
| | 20 | 36,0 | 0,382 |
| | 25 | 39,0 | 0,414 |
| | 30 | 30,0 | 0,318 |
| 5 | 2 | 30,0 | 0,318 |
| | 5 | 30,0 | 0,318 |
| | 10 | 30,0 | 0,318 |
| | 15 | 27,0 | 0,286 |
| | 20 | 27,0 | 0,286 |
| | 25 | 27,0 | 0,286 |
| | 30 | 27,0 | 0,286 |
| $\bar{x}$ | 2 | 27,0 | 0,286 |
| | 5 | 27,2 | 0,288 |
| | 10 | 28,8 | 0,305 |
| | 15 | 29,3 | 0,311 |
| | 20 | 30,6 | 0,324 |
| | 25 | 31,2 | 0,332 |
| | 30 | 28,4 | 0,302 |
| $s_\chi^2$ | 2 | | 0,0008 |
| | 5 | | 0,0013 |
| | 10 | | 0,0006 |
| | 15 | | 0,0004 |
| | 20 | | 0,0031 |
| | 25 | | 0,0039 |
| | 30 | | 0,0008 |
| $s_\chi$ | 2 | | 0,0320 |
| | 5 | | 0,0398 |
| | 10 | | 0,0286 |
| | 15 | | 0,0704 |
| | 20 | | 0,0624 |
| | 25 | | 0,0706 |
| | 30 | | 0,0320 |

1 ug/ml Lyophilisat verbrannter Haut

| | t in Minuten | Strom I in nA | $\lambda$ (mS cm$^{-2}$) |
|---|---|---|---|
| 1 | 2 | 2,0 | 0,021 |
| | 5 | 2,0 | 0,021 |
| | 10 | 4,0 | 0,042 |
| | 15 | 6,0 | 0,063 |
| | 20 | 10,0 | 0,106 |
| | 25 | 12,0 | 0,127 |
| | 30 | 15,0 | 0,159 |
| 2 | 2 | 2,0 | 0,021 |
| | 5 | 2,0 | 0,021 |
| | 10 | 5,0 | 0,053 |
| | 15 | 5,0 | 0,053 |
| | 20 | 11,0 | 0,116 |
| | 25 | 13,0 | 0,138 |
| | 30 | 17,0 | 0,180 |
| 3 | 2 | 2,0 | 0,021 |
| | 5 | 2,0 | 0,021 |
| | 10 | 4,0 | 0,042 |
| | 15 | 6,0 | 0,064 |
| | 20 | 12,0 | 0,127 |
| | 25 | 15,0 | 0,085 |
| | 30 | 17,0 | 0,188 |
| 4 | 2 | 2,0 | 0,021 |
| | 5 | 2,0 | 0,021 |
| | 10 | 4,0 | 0,042 |
| | 15 | 6,0 | 0,064 |
| | 20 | 6,0 | 0,064 |
| | 25 | 8,0 | 0,085 |
| | 30 | 11,0 | 0,116 |
| 5 | 2 | 2,0 | 0,021 |
| | 5 | 2,0 | 0,021 |
| | 10 | 5,0 | 0,053 |
| | 15 | 5,0 | 0,053 |
| | 20 | 8,0 | 0,085 |
| | 25 | 10,0 | 0,106 |
| | 30 | 16,0 | 0,169 |
| $\bar{x}$ | 2 | 2,0 | 0,021 |
| | 5 | 2,0 | 0,021 |
| | 10 | 4,6 | 0,049 |
| | 15 | 5,6 | 0,059 |
| | 20 | 8,4 | 0,099 |
| | 25 | 11,6 | 0,123 |
| | 30 | 15,2 | 0,161 |
| $s_\lambda^2$ | 2 | | 0 |
| | 5 | | 0 |
| | 10 | | 0 |
| | 15 | | 0 |
| | 20 | | 0,0005 |
| | 25 | | 0,0007 |
| | 30 | | 0,0006 |
| $s_\lambda$ | 2 | | 0 |
| | 5 | | 0 |
| | 10 | | 0,0058 |
| | 15 | | 0,0058 |
| | 20 | | 0,0253 |
| | 25 | | 0,0286 |
| | 30 | | 0,0265 |

10 ug/ml denatur. Humanalbumin

| | t in Minuten | Strom I in nA | $\lambda$ (mS $cm^{-2}$) |
|---|---|---|---|
| 1 | 2 | 15,0 | 0,159 |
| | 5 | 21,0 | 0,223 |
| | 10 | 16,0 | 0,169 |
| | 15 | 15,5 | 0,164 |
| | 20 | 16,0 | 0,169 |
| | 25 | 16,0 | 0,169 |
| | 30 | - | - |
| 2 | 2 | 15,3 | 0,162 |
| | 5 | 15,9 | 0,168 |
| | 10 | 15,0 | 0,159 |
| | 15 | 15,0 | 0,159 |
| | 20 | 16,0 | 0,169 |
| | 25 | 16,0 | 0,169 |
| | 30 | - | - |
| 3 | 2 | 15,0 | 0,159 |
| | 5 | 15,0 | 0,159 |
| | 10 | 15,3 | 0,162 |
| | 15 | 15,5 | 0,164 |
| | 20 | 15,0 | 0,159 |
| | 25 | 16,0 | 0,169 |
| | 30 | 16,5 | 0,175 |
| 4 | 2 | 14,4 | 0,152 |
| | 5 | 15,0 | 0,159 |
| | 10 | 15,0 | 0,159 |
| | 15 | 15,5 | 0,164 |
| | 20 | 15,5 | 0,164 |
| | 25 | 15,0 | 0,159 |
| | 30 | 17,0 | 0,180 |
| 5 | 2 | 14,7 | 0,156 |
| | 5 | 14,4 | 0,152 |
| | 10 | 14,7 | 0,156 |
| | 15 | 15,0 | 0,159 |
| | 20 | 11,7 | 0,124 |
| | 25 | 12,0 | 0,127 |
| | 30 | 12,6 | 0,133 |
| $\bar{x}$ | 2 | 14,9 | 0,158 |
| | 5 | 16,3 | 0,172 |
| | 10 | 15,2 | 0,161 |
| | 15 | 15,3 | 0,162 |
| | 20 | 14,8 | 0,157 |
| | 25 | 15,0 | 0,159 |
| | 30 | 15,3 | 0,163 |
| $s_\lambda^2$ | 2 | | 0 |
| | 5 | | 0 |
| | 10 | | 0 |
| | 15 | | 0 |
| | 20 | | 0 |
| | 25 | | 0,0003 |
| | 30 | | 0,0004 |
| $s_\lambda$ | 2 | | 0,0038 |
| | 5 | | 0,0290 |
| | 10 | | 0,0049 |
| | 15 | | 0,0027 |
| | 20 | | 0,0189 |
| | 25 | | 0,0182 |
| | 30 | | 0,0258 |

20 µl Lösungsansatz Meerschweinchenkomplement (25° C)

| | t in Minuten | Strom I in nA | $\Lambda$ (mS cm$^{-2}$) |
|---|---|---|---|
| 1 | 2 | 10,0 | 0,106 |
| | 5 | 15,0 | 0,159 |
| | 10 | 25,0 | 0,265 |
| | 15 | 17,0 | 0,180 |
| | 20 | 39,0 | 0,414 |
| | 25 | 95,0 | 1,008 |
| | 30 | 210,0 | 2,230 |
| 2 | 2 | 8,0 | 0,085 |
| | 5 | 12,0 | 0,127 |
| | 10 | 18,0 | 0,191 |
| | 15 | 19,0 | 0,201 |
| | 20 | 43,0 | 0,456 |
| | 25 | 120,0 | 0,127 |
| | 30 | 197,0 | 0,209 |
| 3 | 2 | 7,0 | 0,074 |
| | 5 | 13,0 | 0,138 |
| | 10 | 15,0 | 0,159 |
| | 15 | 22,0 | 0,233 |
| | 20 | 48,0 | 0,509 |
| | 25 | 80,0 | 0,849 |
| | 30 | 190,0 | 2,016 |
| 4 | 2 | 9,0 | 0,096 |
| | 5 | 13,0 | 0,138 |
| | 10 | 17,0 | 0,180 |
| | 15 | 20,0 | 0,212 |
| | 20 | 45,0 | 0,477 |
| | 25 | 130,0 | 1,380 |
| | 30 | 218,0 | 2,310 |
| 5 | 2 | 9,0 | 0,096 |
| | 5 | 10,0 | 0,106 |
| | 10 | 10,0 | 0,106 |
| | 15 | 23,0 | 0,244 |
| | 20 | 40,0 | 0,424 |
| | 25 | 70,0 | 0,743 |
| | 30 | 205,0 | 2,170 |
| $\bar{x}$ | 2 | 8,6 | 0,091 |
| | 5 | 12,6 | 0,134 |
| | 10 | 17,0 | 0,180 |
| | 15 | 20,2 | 0,214 |
| | 20 | 43,0 | 0,456 |
| | 25 | 99,0 | 1,050 |
| | 30 | 204,0 | 2,163 |
| $s^2_{\Lambda}$ | 2 | | 0,0001 |
| | 5 | | 0,0003 |
| | 10 | | 0,0026 |
| | 15 | | 0,0005 |
| | 20 | | 0,0012 |
| | 25 | | 0,0587 |
| | 30 | | 0,0106 |
| $s_{\Lambda}$ | 2 | | 0,0120 |
| | 5 | | 0,0193 |
| | 10 | | 0,0576 |
| | 15 | | 0,0254 |
| | 20 | | 0,0388 |
| | 25 | | 0,2710 |
| | 30 | | 0,1152 |

20 ul Lösungsansatz Meerschweinchenkomplement (40° C)

| | t in Minuten | Strom I in nA | $\lambda$(mS cm$^{-2}$) |
|---|---|---|---|
| 1 | 2 | 6,0 | 0,064 |
| | 5 | 6,0 | 0,064 |
| | 10 | 9,0 | 0,096 |
| | 15 | 18,0 | 0,191 |
| | 20 | 57,0 | 0,605 |
| | 25 | - | - |
| | 30 | - | - |
| 2 | 2 | 3,0 | 0,032 |
| | 5 | 9,0 | 0,096 |
| | 10 | 39,0 | 0,414 |
| | 15 | 54,0 | 0,573 |
| | 20 | - | - |
| | 25 | - | - |
| | 30 | - | - |
| 3 | 2 | 6,0 | 0,064 |
| | 5 | 12,0 | 0,127 |
| | 10 | 33,0 | 0,350 |
| | 15 | 39,0 | 0,414 |
| | 20 | 90,0 | 0,955 |
| | 25 | 180,0 | 1,912 |
| | 30 | 270,0 | 2,860 |
| 4 | 2 | 27,0 | 0,286 |
| | 5 | 30,0 | 0,318 |
| | 10 | 36,0 | 0,382 |
| | 15 | 57,0 | 0,605 |
| | 20 | 60,0 | 0,636 |
| | 25 | 75,0 | 0,796 |
| | 30 | 102,0 | 1,082 |
| 5 | 2 | 3,0 | 0,032 |
| | 5 | 7,5 | 0,080 |
| | 10 | 15,0 | 0,159 |
| | 15 | 21,0 | 0,223 |
| | 20 | 54,0 | 0,573 |
| | 25 | 69,0 | 0,730 |
| | 30 | 105,0 | 1,114 |
| $\bar{x}$ | 2 | 9,0 | 0,095 |
| | 5 | 12,9 | 0,137 |
| | 10 | 26,4 | 0,280 |
| | 15 | 37,8 | 0,401 |
| | 20 | 65,2 | 0,692 |
| | 25 | 108,0 | 1,146 |
| | 30 | 159,0 | 1,685 |
| $s_\lambda^2$ | 2 | | 0,0093 |
| | 5 | | 0,0086 |
| | 10 | | 0,0164 |
| | 15 | | 0,0294 |
| | 20 | | 0,0235 |
| | 25 | | 0,2941 |
| | 30 | | 0,6901 |
| $s_\lambda$ | 2 | | 0,1077 |
| | 5 | | 0,1040 |
| | 10 | | 0,1431 |
| | 15 | | 0,1918 |
| | 20 | | 0,1770 |
| | 25 | | 0,6642 |
| | 30 | | 1,0174 |

20 ul Lösungsansatz Meerschweinchenkomplement (60° C)

| | t in Minuten | Strom I in nA | $\lambda$ (mS cm$^{-2}$) |
|---|---|---|---|
| 1 | 2 | 3,0 | 0,032 |
| | 5 | 4,5 | 0,048 |
| | 10 | 6,0 | 0,064 |
| | 15 | 7,5 | 0,079 |
| | 20 | 6,0 | 0,064 |
| | 25 | 6,0 | 0,064 |
| | 30 | 6,0 | 0,064 |
| 2 | 2 | 6,0 | 0,064 |
| | 5 | 6,0 | 0,064 |
| | 10 | 12,0 | 0,127 |
| | 15 | 13,5 | 0,143 |
| | 20 | 13,5 | 0,143 |
| | 25 | 21,0 | 0,223 |
| | 30 | 39,0 | 0,414 |
| 3 | 2 | 6,0 | 0,064 |
| | 5 | 6,3 | 0,067 |
| | 10 | 8,7 | 0,086 |
| | 15 | 12,0 | 0,127 |
| | 20 | 24,0 | 0,254 |
| | 25 | 36,0 | 0,382 |
| | 30 | 60,0 | 0,636 |
| 4 | 2 | 9,0 | 0,096 |
| | 5 | 12,6 | 0,133 |
| | 10 | 18,0 | 0,191 |
| | 15 | 36,0 | 0,382 |
| | 20 | 60,0 | 0,636 |
| | 25 | 40,0 | 0,424 |
| | 30 | 56,0 | 0,594 |
| 5 | 2 | 6,0 | 0,064 |
| | 5 | 6,0 | 0,064 |
| | 10 | 11,4 | 0,121 |
| | 15 | 20,4 | 0,216 |
| | 20 | 21,0 | 0,223 |
| | 25 | 21,0 | 0,223 |
| | 30 | 21,0 | 0,223 |
| x1 | 2 | 6,0 | 0,064 |
| | 5 | 7,1 | 0,075 |
| | 10 | 11,1 | 0,118 |
| | 15 | 17,9 | 0,189 |
| | 20 | 24,9 | 0,264 |
| | 25 | 24,8 | 0,263 |
| | 30 | 36,4 | 0,386 |
| $s_\lambda^2$ | 2 | | 0,0004 |
| | 5 | | 0,0009 |
| | 10 | | 0,0019 |
| | 15 | | 0,0112 |
| | 20 | | 0,0390 |
| | 25 | | 0,0166 |
| | 30 | | 0,0474 |
| $s_\lambda$ | 2 | | 0,0225 |
| | 5 | | 0,0333 |
| | 10 | | 0,0485 |
| | 15 | | 0,1184 |
| | 20 | | 0,2208 |
| | 25 | | 0,1441 |
| | 30 | | 0,2434 |

20 ul Lösungsansatz Meerschweinchenkomplement (80° C)

| | t in Minuten | Strom I in nA | $\Lambda$ (mS cm$^{-2}$) |
|---|---|---|---|
| 1 | 2 | 6,0 | 0,064 |
| | 5 | 6,0 | 0,064 |
| | 10 | 7,5 | 0,080 |
| | 15 | 9,0 | 0,096 |
| | 20 | 16,5 | 0,175 |
| | 25 | 21,0 | 0,223 |
| | 30 | 27,0 | 0,286 |
| 2 | 2 | 3,0 | 0,032 |
| | 5 | 4,5 | 0,047 |
| | 10 | 6,0 | 0,064 |
| | 15 | 8,4 | 0,089 |
| | 20 | 10,2 | 0,108 |
| | 25 | 12,6 | 0,133 |
| | 30 | 14,4 | 0,152 |
| 3 | 2 | 6,0 | 0,064 |
| | 5 | 6,0 | 0,064 |
| | 10 | 10,5 | 0,111 |
| | 15 | 10,5 | 0,111 |
| | 20 | 21,0 | 0,223 |
| | 25 | 27,0 | 0,286 |
| | 30 | 30,0 | 0,318 |
| 4 | 2 | 6,0 | 0,064 |
| | 5 | 6,0 | 0,064 |
| | 10 | 6,0 | 0,064 |
| | 15 | 7,0 | 0,074 |
| | 20 | 7,0 | 0,074 |
| | 25 | 7,0 | 0,074 |
| | 30 | 9,0 | 0,096 |
| 5 | 2 | 9,0 | 0,096 |
| | 5 | 9,0 | 0,096 |
| | 10 | 9,0 | 0,096 |
| | 15 | 12,0 | 0,127 |
| | 20 | 15,0 | 0,159 |
| | 25 | 15,0 | 0,159 |
| | 30 | 15,0 | 0,159 |
| $\bar{x}$ | 2 | 6,0 | 0,064 |
| | 5 | 6,3 | 0,067 |
| | 10 | 7,8 | 0,083 |
| | 15 | 9,4 | 0,099 |
| | 20 | 13,9 | 0,148 |
| | 25 | 16,5 | 0,175 |
| | 30 | 19,1 | 0,202 |
| $s_\Lambda^2$ | 2 | | 0,0004 |
| | 5 | | 0,0002 |
| | 10 | | 0,0003 |
| | 15 | | 0,0003 |
| | 20 | | 0,0027 |
| | 25 | | 0,0054 |
| | 30 | | 0,0072 |
| $s_\Lambda$ | 2 | | 0,0225 |
| | 5 | | 0,0176 |
| | 10 | | 0,0203 |
| | 15 | | 0,0203 |
| | 20 | | 0,0581 |
| | 25 | | 0,0818 |
| | 30 | | 0,0951 |

1 ug Nativ-Fraktion $A_I$ mit 20 ul Meerschweinchenkomplement (25° C

| | t in Minuten | Strom I in nA | $\lambda$ (mS $cm^{-2}$) |
|---|---|---|---|
| 1 | 2 | 10,0 | 0,106 |
| | 5 | 25,0 | 0,265 |
| | 10 | 39,0 | 0,414 |
| | 15 | 55,0 | 0,583 |
| | 20 | 87,0 | 0,923 |
| | 25 | 98,0 | 1,040 |
| | 30 | 130,0 | 1,380 |
| 2 | 2 | 12,0 | 0,127 |
| | 5 | 28,0 | 0,297 |
| | 10 | 46,0 | 0,424 |
| | 15 | 49,0 | 0,520 |
| | 20 | 81,0 | 0,859 |
| | 25 | 91,0 | 0,966 |
| | 30 | 110,0 | 1,160 |
| 3 | 2 | 12,0 | 0,122 |
| | 5 | 26,0 | 0,276 |
| | 10 | 43,0 | 0,456 |
| | 15 | 51,0 | 0,541 |
| | 20 | 83,0 | 0,887 |
| | 25 | 94,0 | 0,997 |
| | 30 | 105,0 | 1,110 |
| 4 | 2 | 12,0 | 0,127 |
| | 5 | 19,0 | 0,201 |
| | 10 | 27,0 | 0,286 |
| | 15 | 43,0 | 0,456 |
| | 20 | 69,0 | 0,732 |
| | 25 | 85,0 | 0,902 |
| | 30 | 90,0 | 0,955 |
| 5 | 2 | 9,0 | 0,096 |
| | 5 | 25,0 | 0,265 |
| | 10 | 35,0 | 0,371 |
| | 15 | 55,0 | 0,583 |
| | 20 | 78,0 | 0,828 |
| | 25 | 80,0 | 0,944 |
| | 30 | 117,0 | 1,240 |
| $\bar{x}$ | 2 | 11,0 | 0,116 |
| | 5 | 24,6 | 0,261 |
| | 10 | 36,8 | 0,390 |
| | 15 | 50,6 | 0,537 |
| | 20 | 79,6 | 0,845 |
| | 25 | 91,4 | 0,970 |
| | 30 | 110,4 | 1,169 |
| $s_\lambda^2$ | 2 | | 0,0002 |
| | 5 | | 0,0010 |
| | 10 | | 0,0034 |
| | 15 | | 0,0022 |
| | 20 | | 0,0041 |
| | 25 | | 0,0022 |
| | 30 | | 0,0197 |
| $s_\lambda$ | 2 | | 0,0148 |
| | 5 | | 0,0358 |
| | 10 | | 0,0657 |
| | 15 | | 0,0527 |
| | 20 | | 0,0718 |
| | 25 | | 0,0523 |
| | 30 | | 0,1573 |

20 ul Lösungsansatz Meerschweinchenkomplement (25° C)
mit 0,1 ül/ml s. coli-Toxin

| | t in Minuten | Strom I in nA | $\lambda$ (mS $cm^{-2}$) |
|---|---|---|---|
| 1 | 2 | 7,0 | 0,074 |
| | 5 | 12,0 | 0,127 |
| | 10 | 25,0 | 0,265 |
| | 15 | 43,0 | 0,456 |
| | 20 | 71,0 | 0,753 |
| | 25 | 88,0 | 0,934 |
| | 30 | 170,0 | 1,800 |
| 2 | 2 | 9,0 | 0,096 |
| | 5 | 18,0 | 0,191 |
| | 10 | 29,0 | 0,307 |
| | 15 | 51,0 | 0,541 |
| | 20 | 69,0 | 0,732 |
| | 25 | 79,0 | 0,838 |
| | 30 | 155,0 | 1,640 |
| 3 | 2 | 10,0 | 0,106 |
| | 5 | 17,0 | 0,180 |
| | 10 | 27,0 | 0,286 |
| | 15 | 49,0 | 0,520 |
| | 20 | 61,0 | 0,647 |
| | 25 | 89,0 | 0,944 |
| | 30 | 176,0 | 1,860 |
| 4 | 2 | 8,0 | 0,085 |
| | 5 | 15,0 | 0,159 |
| | 10 | 29,0 | 0,307 |
| | 15 | 51,0 | 0,541 |
| | 20 | 76,0 | 0,806 |
| | 25 | 91,0 | 0,966 |
| | 30 | 157,0 | 1,660 |
| 5 | 2 | 11,0 | 0,165 |
| | 5 | 17,0 | 0,180 |
| | 10 | 31,0 | 0,329 |
| | 15 | 53,0 | 0,562 |
| | 20 | 80,0 | 0,849 |
| | 25 | 95,0 | 1,008 |
| | 30 | 157,0 | 1,710 |
| $\bar{x}$ | 2 | 9,0 | 0,096 |
| | 5 | 15,8 | 0,167 |
| | 10 | 28,2 | 0,299 |
| | 15 | 49,4 | 0,524 |
| | 20 | 71,4 | 0,757 |
| | 25 | 88,4 | 0,938 |
| | 30 | 163,8 | 1,734 |
| $s_\lambda^2$ | 2 | | 0,0010 |
| | 5 | | 0,0005 |
| | 10 | | 0,0005 |
| | 15 | | 0,0013 |
| | 20 | | 0,0047 |
| | 25 | | 0,0031 |
| | 30 | | 0,0070 |
| $s_\lambda$ | 2 | | 0,0359 |
| | 5 | | 0,0254 |
| | 10 | | 0,0242 |
| | 15 | | 0,0408 |
| | 20 | | 0,0768 |
| | 25 | | 0,0627 |
| | 30 | | 0,0937 |

# L e b e n s l a u f

Am 6. Mai 1954 wurde ich, Michael Roggenbrod, als Sohn des Konrektors Adolf Roggenbrod und der Dorothea Roggenbrod, geb. Lohmann in Albstadt-Ebingen geboren.

Ab April 1961 besuchte ich die Grundschule in Bitz/Zollernalbkreis und wechselte 1965 auf das math.-nat. Gymnasium Ebingen über. Dort legte ich 1973 die Reifeprüfung ab.

Von Oktober 1973 bis Dezember 1974 leistete ich meinen Grundwehrdienst im Sanitätsdienst der Bundeswehr in Stetten a.k.M. und in Osnabrück ab.

Im Sommersemester 1975 nahm ich das Studium der Biologie (Diplom) an der Universität Tübingen auf und legte im April 1977 die Diplom-Vorprüfung ab. Inzwischen hatte ich im Wintersemester 1976/77 das Studium der Humanmedizin an der Universität Ulm begonnen, das ich ab dem Sommersemester 1978 in Tübingen weiterführte. Im August 1978 bestand ich die Ärztliche Vorprüfung, im August 1979 den ersten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung. Im Jahre 1979 begann ich auch mit den Arbeiten zur Dissertation.

Im Juli 1980 heiratete ich die Staatsanwältin Sabine Roggenbrod, geb. Öhler.

Im August 1981 legte ich den zweiten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung ab und begann im Oktober 1981 mit dem Praktischen Jahr an der Universitätsklinik Tübingen.

Am 5. November 1982 habe ich den dritten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung abgelegt.